

Aline Vivian Vatti Auada

Obtenção de peptídeos bioativos (criptídeos) pela ação da tripsina e serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca* sobre substratos endógenos

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:** Prof. Dr. Ivo Lebrun

São Paulo

2011

Aline Vivian Vatti Auada

Obtenção de peptídeos bioativos (criptídeos) pela ação da tripsina e serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca* sobre substratos endógenos

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:** Prof. Dr. Ivo Lebrun

São Paulo

2011

#### FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Auada, Aline Vivian Vatti

Obtenção de peptídeos bioativos (criptídeos) pela ação da tripsina e serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca* sobre substratos endógenos / Aline Vivian Vatti Auada - São Paulo, 2011.

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: Ivo Lebrun

1. Veneno de serpentes 2. *Bothrops* 3. Peptídeos 4. Peptídeos/classificação 5. Serina proteases

SES/CCD/CD-242/11

Dedico este trabalho a  
todos àqueles que  
acreditam que a ousadia e  
o erro são caminhos para  
as grandes realizações.

À Deus, por me dar forças para  
todos os dias conseguir  
superar as barreiras.

Aos meus pais e irmãos pelo  
incentivo e força nos  
momentos mais difíceis.

Ao meu marido pela compreensão  
e ajuda neste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Instituto Butantan, pela oportunidade de desenvolver o meu projeto de mestrado e pela infra-estrutura.

Ao Dr. Ivo Lebrun pela orientação, dedicação e paciência de todos dias. Gostaria de agradecer especialmente pelo apoio profissional e pessoal.

À Capes, pela concessão de bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), pela concessão do projeto (2010/51077-5).

À minha família, pais e irmãos, que sempre me apoiaram em minhas decisões, sendo erros ou acertos e sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu marido, Junior, que sempre estava ao meu lado dando apoio e ajudando muito na realização deste trabalho.

Aos meus avôs, Bisavó e tios, que sempre me incentivaram a persistir nesta escolha, conversando e passando toda a experiência que podiam.

Às amigas, Patrícia, Silvana, Antonia, Valdeli, Márcia e Beatriz, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, que sempre estavam prontas para auxiliar no que fosse preciso.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, do Instituto Butantan, onde aprendi que trabalhar em equipe é muito melhor que sozinho, onde aprendi que cultura e o aprendizado podem ser passados a diante em uma mera conversa na salinha de café, ou em uma reunião de final de ano, ou então em um almoço comemorando o aniversário de algum de nós do laboratório.

Aos amigos, Ricardo, Jéssica, Kleber e Juliana, que durante este trabalho estavam sempre lá para tirar dúvidas, trabalhar, conversar e também para dar boas risadas.

À Dra. Luziane pelas sugestões e conversas, sempre muito necessárias.

À grande amiga Dra. Maisa Splendore Della-Casa, pela imensa ajuda em todas as situações. Agradecimento muito especial, tornou-se uma amiga muito importante.

Aos amigos que às vezes mesmo longe estão perto, Márcio, Raquel, Marcelo, Gustavo, Karl, Maria Cristina, Katie.

Aos amigos Dra. Isabel de Fátima Correia Batista e Dr. Rafael Marques Porto, que seqüenciaram os peptídeos encontrados e que estavam sempre dispostos a ajudar nas dúvidas.

Ao Dr. Robson de Mello, do Laboratório do CAT/CEPID, pela síntese dos peptídeos necessários.

À Dra. Kátia Cristina Barbaro, que além das conversas também ajudou na correção final dessa dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia, que se tornaram pessoas muito importantes para mim.

Aos membros da secretaria da Pós-Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, pelos valiosos ensinamentos.

A todos os membros que participaram da minha banca de qualificação e defesa contribuindo com suas críticas e sugestões.

A todos que sempre me ajudaram nesta etapa e que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

## RESUMO

As serinoproteases e metaloproteases são as principais enzimas do veneno de *Bothrops jararaca*, elas agem sobre as proteínas dos tecidos das vítimas ou presas, e como resultado de suas ações diretas, essas proteases podem gerar peptídeos com ações específicas em células ou ainda afetar mecanismos fisiológicos. As fontes mais comuns de peptídeos bioativos são as proteínas precursoras naturais. No entanto, estudos recentes têm mostrado que existem outras fontes de peptídeos bioativos, as cripteínas, que fazem parte de uma nova classe de proteínas que não são consideradas precursoras, mas sob certas condições, originam peptídeos bioativos, assim eles são denominados criptídeos. Os criptídeos podem provocar efeitos relevantes na questão do envenenamento, causando efeitos secundários ou indiretos. Neste trabalho, esses criptídeos gerados pela ação das serinoproteases do veneno e pela ação da tripsina sobre substratos endógenos, foram isolados, e em seguida foram caracterizados bioquimicamente e biologicamente de acordo com suas ações em células. As serinoproteases do veneno de *B. jararaca* foram separadas do veneno total utilizando CLAE com uma coluna de exclusão molecular, estas serinoproteases foram então incubadas com o substrato mioglobina. Como também foi utilizado a tripsina, foram escolhidos os seguintes substratos, mioglobina, hemoglobina, imunoglobulina G e colágeno, que foram incubados com a tripsina. Os criptídeos gerados foram separados por fracionamento por CLAE e as frações foram testadas em culturas de células para observar efeitos citotóxicos ou proliferativos. As frações ativas foram repurificadas para obter criptídeos puros. Com a atividade desses criptídeos confirmada, estes foram sequenciados e sintetizados. A ação da tripsina sobre a mioglobina gerou criptídeos (ALELFR, TGHPETLEK, GLSDGEWQQVLNVWGK) que apresentaram atividade proliferativa em células do tipo fibroblastos e endoteliais. Utilizando um programa de bioinformática, Cn3D, observou-se que os criptídeos gerados pela hidrólise da mioglobina com a tripsina, estão localizados na parte externa da proteína íntegra. Também foram encontradas frações bioativas depois da incubação dos outros substratos, mencionados acima, utilizando a tripsina, mas não foi possível

sequenciá-los. A incubação da mioglobina com as serinoproteases isoladas do veneno de *B. jararaca* gerou um cromatograma similar ao obtido com a incubação da tripsina, mostrando que estas serinoproteases podem gerar criptídeos que podem ter efeitos secundários não neutralizados por soroterapia. Este estudo sugere que as serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca* podem gerar criptídeos com efeitos relevantes através de suas ações nas proteínas (substratos) que estão altamente disponíveis no local da picada.

## ABSTRACT

Serineproteases and metalloproteases are the main *Bothrops jararaca* venom enzymes acting on the victim's tissues and proteins. As a result of their direct actions on tissue proteins, these proteases could generate peptides with specific actions in cells or other mechanisms. The most common sources for bioactive peptides are natural precursor proteins. Recent studies have shown that a new class of proteins not named as precursors, the crypteins, may, in some conditions, originate bioactive peptides, or cryptides. New cryptides generated by the action of the venom serineproteases and by commercial trypsin on endogenous substrates, were isolated, then biochemically and biologically characterized. Serineproteases from *B. jararaca* venom were separated from the whole venom using an HPLC molecular exclusion column, verifying the activity of the fractions on the chosen substrates (myoglobin, hemoglobin, immunoglobulin G and collagen). These substrates were incubated with the venom serineproteases as well as with trypsin. The resulting peptides were separated by fractionation by HPLC and the fractions were tested on cell cultures for proliferative or cytotoxic effects. Active fractions were rechromatographed in order to obtain the pure bioactive peptides. After the activity was confirmed, the peptides were sequenced and synthesized. Trypsin activity on myoglobin generated peptides (ALELFR, TGHPETLEK, GLSDGEWQQVLNVWGK) presenting proliferative activity on fibroblasts and endothelial cells. 3D modeling of myoglobin, using Cn3D software, showed that the three peptides are located on the surface of the protein. Bioactive fractions were also found after digestion of the other substrates mentioned above with trypsin, but they were not yet isolated and sequenced. Digestion of myoglobin with the venom serineproteases generated an HPLC profile similar to the one obtained with trypsin. This suggests that the cryptides here described may indeed be generated at the the snake bite site, causing secondary effects, not neutralized by serumtherapy. This study suggests that the venom serineproteases may generate cryptides with relevant effects through their actions on highly available protein substrates at the bite site.

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg – Microgramas

ACN – Acetonitrila

ADAMs – A [Disintegrin](#) And [Metalloproteinase](#)

ADAMTs – A [Disintegrin](#) And [Metalloproteinase](#) with Thrombospondin Motifs

Asp102 – Ácido aspártico na posição 102

BAPNA – Benzoil-arginil-p-nitroanilida

BPP – Peptídeos potencializadores de bradicinina.

BSA – Soro albumina bovina

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico

ECA – Enzima conversora de angiotensina

Fc IgG – porção Fc da cadeia pesada da imunoglobulina G.

FfDP – Produtos da degradação do fibrinogênio.

Fn1 – Fibroblastos humanos normais

His57 – Histidina na posição 57

HUVEC's – Células endoteliais

kDa – Kilodaltons

m – Metro.

M – Molar

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MMPs – Metaloproteinases de matrix

N – Normalidade

nm – Nanometro

° C – Graus Celsius

POMC – Próopiomelanocortina

pSPBJ – *pool* de serinoproteases de *Bothrops jararaca*.

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Ser195 – Serina na posição 195

SVMPs – Metaloproteinases do veneno de *Bothrops jararaca*.

SVSPs – Serinoproteases do veneno de serpente

T – Tripsina

TCA – Ácido Tricloracético

TFA – Ácido Trifluoracético

UV – Ultra violeta

VWF – Fator de Von Willebrand.

Aminoácidos:

A – Alanina

C – Cisteína

D – Ácido aspartico

F – Fenilalanina

G – Glicina

H - Histidina

K – Lisina

L – Leucina

M – Metionina

N – Asparagina

P – Prolina

Q – Glutamina

R - Arginina

S – Serina

T – Treonina

V – Valina

W – Triptofano

Y – Tirosina

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das cripteínas em três tipos.....	41
Tabela 2: Concentração estimada das amostras hidrolisadas, determinado por Bradford.....	62
Tabela 3: Sequência obtida por degradação de Edman, dos peptídeos gerados pela hidrólise da mioglobina com tripsina.....	69
Tabela 4: peptídeos seqüenciados com suas características bioquímicas determinadas pelo programa Expasy.....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das espécies de <i>Bothrops</i> no Brasil.....	24
Figura 2: Número de ampolas de soro antiofídico indicado para cada tipo de gravidade do acidente.....	25
Figura 3: Incidência dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil entre 1987 a 2008.....	26
Figura 4: Incidência de acidentes ofídicos por regiões.....	27
Figura 5: Ocorrência por tipo de envenenamento indicando predomínio dos acidentes botrópicos em todo o país.....	27
Figura 6: Os processos fisiológicos da hemostasia. Ação de várias famílias de proteínas do veneno nas três vias de hemostasia.....	32
Figura 7: Domínios estruturais e peptídeos críticos de colágeno XVIII e colágeno IV de mamíferos.....	40
Figura 8: Peptídeos humanos clássicos e precursores críticos.....	42
Figura 9: Possível correlação evolutiva das cripteínas, árvore crítica.....	43
Figura 10: Cromatograma obtido por CLAE, mostrando as frações coletadas, correspondente da mistura de serinoproteinases provenientes do veneno total de <i>Bothrops jararaca</i> .....	56
Figura 11: Gel SDS-PAGE 15% mostrando as frações obtidas do veneno total de <i>Bothrops jararaca</i> .....	57
Figura 12: Atividade proteolítica das frações.....	58
Figura 13: Atividade proteolítica das frações utilizando caseína 1% como substrato.....	59
Figura 14: Atividade proteolítica das frações utilizando caseína 1% como substrato na presença de EDTA .....	60
Figura 15: Atividade proteolítica utilizando BAPNA como substrato.....	61
Figura 16: Gel SDS-PAGE 15% mostrando a hidrólise dos substratos.....	62
Figura 17: Gel de SDS-PAGE 12,5% mostrando os substratos antes da hidrólise.....	63
Figura 18: Cromatograma do hidrolisado de mioglobina com tripsina por 18 horas.....	64

Figura 19: Cromatograma do hidrolisado de hemoglobina com tripsina por 18 horas.....	65
Figura 20: Cromatograma do hidrolisado da porção Fc da cadeia pesada da IgG por 18 horas.....	65
Figura 21: Cromatograma do hidrolisado de colágeno tipo I com tripsina por 18 horas.....	66
Figura 22: Coleta das frações da hidrólise de mioglobina com tripsina.....	67
Figura 23: Teste de viabilidade celular com as frações obtidas da hidrólise da mioglobina com tripsina.....	68
Figura 24: Coleta dos picos da hidrólise da mioglobina com tripsina.....	69
Figura 25: Análise da polaridade do peptídeo GLSDGEWQQVLNVWGK.....	71
Figura 26: Análise da polaridade do peptídeo TGHPETLEK.....	71
Figura 27: Análise da polaridade do peptídeo ALELFR.....	71
Figura 28: Análise das possíveis clivagens pela hidrólise de mioglobina com tripsina.....	72
Figura 29: Análise da localização dos peptídeos, obtidos pela hidrólise de mioglobina com tripsina, no substrato íntegro.....	73
Figura 30: Teste de viabilidade celular, em células Fn1, utilizando o peptídeo TGHPETLEK.....	75
Figura 31: Teste de viabilidade celular, em células Fn1, utilizando o peptídeo GLSDGEWQQVLNVWGK.....	75
Figura 32: Teste de viabilidade celular, em células Fn1, utilizando o peptídeo ALELFR.....	76
Figura 33: Teste de viabilidade celular, em células Fn1, utilizando o peptídeo sintético.....	77
Figura 34: Teste de quantificação da produção de colágeno, utilizando o peptídeo TGHPETLEK.....	78
Figura 35: Teste de quantificação da produção de colágeno, utilizando o peptídeo GLSDGEWQQVLNVWGK.....	78
Figura 36: Teste de quantificação da produção de colágeno, utilizando o peptídeo ALELFR.....	79
Figura 37: Teste de quantificação da produção de colágeno, utilizando o peptídeo sintético.....	79

Figura 38: Teste de viabilidade celular, em células HUVEC's, utilizando o peptídeo TGHPETLEK.....	80
Figura 39: Teste de viabilidade celular, em células HUVEC's, utilizando o peptídeo GLSDGEWQQVLNVWGK.....	81
Figura 40: Teste de viabilidade celular, em células HUVEC's, utilizando o peptídeo sintético.....	81
Figura 41: Coleta das frações da hidrólise de hemoglobina com tripsina.....	82
Figura 42: Teste de viabilidade celular, em células Fn1, utilizando as frações da hidrólise de hemoglobina com tripsina.....	83
Figura 43: Coleta dos picos da hidrólise da hemoglobina com tripsina.....	84
Figura 44: Teste de viabilidade celular, em células Fn1, utilizando o pico 1 da hidrólise da hemoglobina com tripsina.....	85
Figura 45: Quantificação da produção de colágeno utilizando o pico 1 da hidrólise de hemoglobina com tripsina.....	86
Figura 46: Análise das possíveis clivagens da hidrólise de hemoglobina com tripsina.....	87
Figura 47: Coleta das frações da hidrólise de colágeno com tripsina.....	88
Figura 48: Teste de viabilidade celular, em células Fn1, utilizando as frações da hidrólise de colágeno com tripsina.....	89
Figura 49: Coleta dos picos da hidrólise do colágeno com a tripsina.....	90
Figura 50: Coleta das frações da hidrólise da porção Fc da cadeia pesada da imunoglobulina G.....	91
Figura 51: Teste de viabilidade celular, em células Fn1, utilizando as frações da hidrólise da porção Fc da cadeia pesada da imunoglobulina G com tripsina....	92
Figura 52: Coleta dos picos da hidrólise da porção Fc da cadeia pesada da imunoglobulina G.....	93
Figura 53: Cromatograma comparativo entre as hidrólises de mioglobina com tripsina e com pSPBJ.....	95

# Índice

RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XVII
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Aspectos gerais dos acidentes ofídicos no Brasil	23
1.2. Principais atividades do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	28
1.2.1. Atividade inflamatória aguda	29
1.2.2. Atividade sobre a coagulação e plaquetas	30
1.2.3. Atividade hemorrágica	33
1.3. Composição do veneno	33
1.3.1 Complexos da Protease	34
1.3.1.1 Metaloproteinasas:	34
1.3.1.2 Serinoproteinasas:	35
1.4 Geração de compostos bioativos a partir de componentes presentes em venenos:	36
1.5 Cripteínas	38
1.6 Proteínas consideradas cripteínas:	41
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Material	46
3.1.1 Veneno	46
3.1.2 Células	46
3.1.3 Lista de reagentes	46
3.1.4 Lista de equipamentos	48
3.2 MÉTODOS	48
3.2.1 Isolamento de Serinoproteases do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	48
3.2.2 Dosagem de proteínas	49
3.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS	49
3.2.4 Atividade proteolítica das frações isoladas do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	50
3.2.5 Hidrólise dos substratos endógenos	50
3.2.6 Precipitação dos hidrolisados	51
3.2.7 Purificação dos peptídeos obtidos pela hidrólise dos substratos endógenos	51
3.2.8 Sequenciamento de peptídeo	52
3.2.9 Síntese de peptídeos	52
3.2.10 Cultura de células	52
3.2.11 Teste de viabilidade celular	53
3.2.12 Quantificação Da produção de colágeno pelos peptídeos bioativos por espectrofotometria com Picrosirius red	53
3.2.13 Análise de bioinformática	55
4 RESULTADOS	56
4.1 Isolamento de Serinoproteases do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	56
4.2 Atividade proteolítica das frações isoladas do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	58

4.3 Hidrólise dos substratos endógenos	61
4.4 Determinação do tempo ideal de incubação para a hidrólise dos substratos	64
4.5 Isolamento e caracterização dos compostos obtidos através da hidrólise da mioglobina com tripsina	66
4.5.1 Isolamento das frações obtidas do hidrolisado de mioglobina com tripsina	66
4.5.2 Teste de viabilidade celular (Fn1) com as frações da hidrólise de mioglobina com tripsina	67
4.5.3 Purificação dos peptídeos	68
4.5.4 Sequenciamento de peptídeo	69
4.5.5 Síntese de peptídeos	74
4.5.6 Teste de viabilidade celular (Fn1) com os picos purificados da hidrólise da mioglobina com tripsina	74
4.5.7 Quantificação da produção de colágeno por espectrofotometria com Picrosirius red	77
4.5.8 Teste viabilidade celular em HUVEC's com peptídeos da mioglobina	80
4.6 Isolamento e caracterização dos compostos obtidos através da hidrólise da hemoglobina com tripsina.	82
4.6.1 Isolamento das frações obtidas do hidrolisado de hemoglobina com tripsina	82
4.6.2 Teste de viabilidade celular (Fn1) com as frações da hidrólise de hemoglobina com tripsina	83
4.6.3 Purificação dos peptídeos	84
4.6.4 Teste de viabilidade celular (FN1) com picos da hidrólise de hemoglobina com tripsina	84
4.6.5 Picrosirius red	85
4.6.6 Análise das possíveis clivagens da hidrólise de hemoglobina com tripsina	86
4.7 Isolamento e caracterização dos compostos obtidos através da hidrólise do colágeno com tripsina	87
4.7.1 isolamento das frações obtidas dos hidrolisados de colágeno com tripsina	87
4.7.2 Teste viabilidade celular com as frações da hidrólise de colágeno com tripsina	88
4.7.3 Purificação dos peptídeos	89
4.8 Isolamento e caracterização dos compostos obtidos através da hidrólise da porção Fc da cadeia pesada da IgG com tripsina.	90
4.8.1 Isolamento das frações obtidas dos hidrolisados da porção Fc da cadeia pesada da IgG com tripsina	90
4.8.2 Teste viabilidade celular com as frações da hidrólise da porção Fc da cadeia pesada da IgG com tripsina	91
4.8.3 Purificação dos peptídeos	92
5. Determinar o melhor tempo de hidrólise dos substratos utilizando Pspbj	93
5.1 Precipitação do hidrolisado com pSPBJ	94
5.2 Purificação dos peptídeos gerados a partir da hidrólise de mioglobina com pSPBJ	94
6. DISCUSSÃO	97

7. CONCLUSÃO	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS	114
ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	115
ANEXO 2: ARTIGO PUBLICADO	117
ANEXO 3: ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	137

# 1. Introdução

## 1.1 Aspectos gerais dos acidentes ofídicos no Brasil

O ofidismo encontra-se impregnado de forma negativa no imaginário popular, principalmente relacionado ao aspecto anatômico repulsivo das serpentes. Entretanto a apreensão gerada, não tem sido suficiente para o controle dos acidentes. Historicamente, os acidentes ofídicos já são descritos desde o ano de 1838, segundos dados da Santa Casa do Rio de Janeiro, onde registraram um total de 1.044 óbitos, e um caso refere-se à picada de cobra e o registro feito pela Princesa Isabel em seu diário, datado de 8 de Novembro de 1884, onde o então príncipe herdeiro da coroa Brasileira, Dom Pedro de Orleans e Bragança, quase teve um acidente com *Bothrops jararaca* (Karasch, 2000).

As serpentes são animais que despertam grande interesse na sociedade pela capacidade que alguns grupos apresentam em causar acidentes graves. O Brasil possui uma fauna de serpentes composta por aproximadamente 265 espécies, classificadas dentro de aproximadamente 73 gêneros, em 9 famílias (Ministério da Saúde, 2001)

Segundo o Ministério da Saúde (2001), no Brasil há quatro tipos de acidente que são considerados de interesse em saúde: botrópico, crotálico, laquétrico e elapídico. Já os acidentes por serpentes não peçonhentas que são relativamente frequentes, mas, não determinam acidentes graves, e, por isso, são considerados de menor importância médica.

O gênero *Bothrops* representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em todo território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias*). As principais espécies são: *Bothrops atrox*, é o ofídio mais encontrado na Amazônia, principalmente, em beiras de rios e igarapés; *Bothrops erythromelas*, abundante nas áreas litorâneas e úmidas da região Nordeste; *Bothrops jararaca*, tem grande capacidade adaptativa, ocupa e coloniza áreas silvestres, agrícolas e periurbanas, sendo a espécie mais comum da região Sudeste; *Bothrops*

*jararacussu*, é a espécie que pode alcançar maior comprimento e a que produz maior quantidade de veneno dentre as serpentes do gênero, predominante no Sul e Sudeste; *Bothrops moojeni*, principal espécie dos cerrados, capaz de se adaptar aos ambientes modificados, com comportamento agressivo e porte avantajado e *Bothrops alternatus*, vive em campos e outras áreas abertas, desde a região Centro-oeste até o Sul, como pode ser observado na figura 1 (Melgarejo, 2003).



Figura 1: Distribuição das espécies de *Bothrops* no Brasil, adaptado de Melgarejo, 2003.

Nos primeiros instantes após a picada, o acidente botrópico se evidencia com a presença de edema, dor e equimose na região da picada, que progride ao longo do membro acometido. As principais ações do veneno de *Bothrops jararaca* são: ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. Já as complicações locais são decorrentes da necrose e da infecção secundária que podem levar à amputação e/ou déficit funcional do membro. Também pode haver manifestações sistêmicas como, sangramento em pele e mucosas, hematúria, hematêmese e hemorragia em outras cavidades que podem determinar risco ao paciente. Estudos mostram que, bioquimicamente, essas complicações são resultados do consumo sequencial dos fatores da coagulação, especialmente o fibrinogênio, com drástico aumento da fibrinólise, complexo trombina-antitrombina, presença de produtos da degradação do fibrinogênio (FfDP – Fibrinogen degradation products) e severa trombocitopenia (Kamigutti et al., 1991; Santoro ET AL., 2008; Santoro e Sano-Martins, 2004).

A administração do soro antiveneno é realizado de acordo com o acidente, ou seja, é utilizado o soro antiveneno específico, respeitando a gravidade do envenenamento e também respeitando as doses indicadas como mostra na figura 2.

Acidentes	Soros	Gravidade	Nº ampolas
Botrópico	Antibotrópico (SAB)	Leve: quadro local discreto, sangramento em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação	2 a 4
	Antibotrópico-laquéutico (SABL)	Moderado: edema e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação	5 a 8
		Grave: alterações locais intensas, hemorragia grave, hipotensão, anúria	12
Laquéutico	Antibotrópico-laquéutico (SABL)	Moderado: quadro local presente, pode haver sangramentos, sem manifestações vagas	10
		Grave: quadro local intenso, hemorragia intensa, com manifestações vagas	20
		Leve: alterações neuromusculares discretas; sem mialgia, escurecimento da urina ou oligúria	5
Crotálico	Anticrotálico (SAC)	Moderado: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobinúria (urina escura) discretas, porém discretas	10
		Grave: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobinúria intensas, oligúria	20
Elapídico	Anti-elapídico (SAE)	Considerar todos os casos potencialmente graves pelo risco de insuficiência respiratória	10

Figura 2: Número de ampolas de soro antiofídico indicado para cada tipo de gravidade do acidente (Ministério da Saúde, 2009).

Os antivenenos são produtos feitos essencialmente de imunoglobulina G, estes são produzidos pelo fracionamento do plasma de animais, eqüinos, que são hiperimunizados com o veneno do animal específico. A fabricação destes antivenenos tem uma longa história de eficácia e induz poucas reações adversas devido a natureza heteróloga mas, pode causar reações de hipersensibilidade imediata. Por outro lado os testes de sensibilidade cutânea não são recomendados, pois, além de terem baixo valor preditivo, retardam o início da soroterapia( Segura ET AL., 2009; Chippaux ET AL., 1998; Gutierrez ET AL., 2006).

De acordo com o Guia de Vigilância Epidemiológica (Ministério da Saúde, 2009), o número de notificações de ofidismo tem aumentado consideravelmente desde 2001, alcançando o maior índice em 2005 (Figura 3). Desde então vem apresentando decréscimo, com registro de 26.156 acidentes em 2008, correspondendo à incidência de 13,8 casos por 100.000 habitantes no Brasil, a menor desde 2005. Apresentando uma variação significativa por região, com os coeficientes mais elevados no Norte e Centro-oeste como mostra a figura 4.

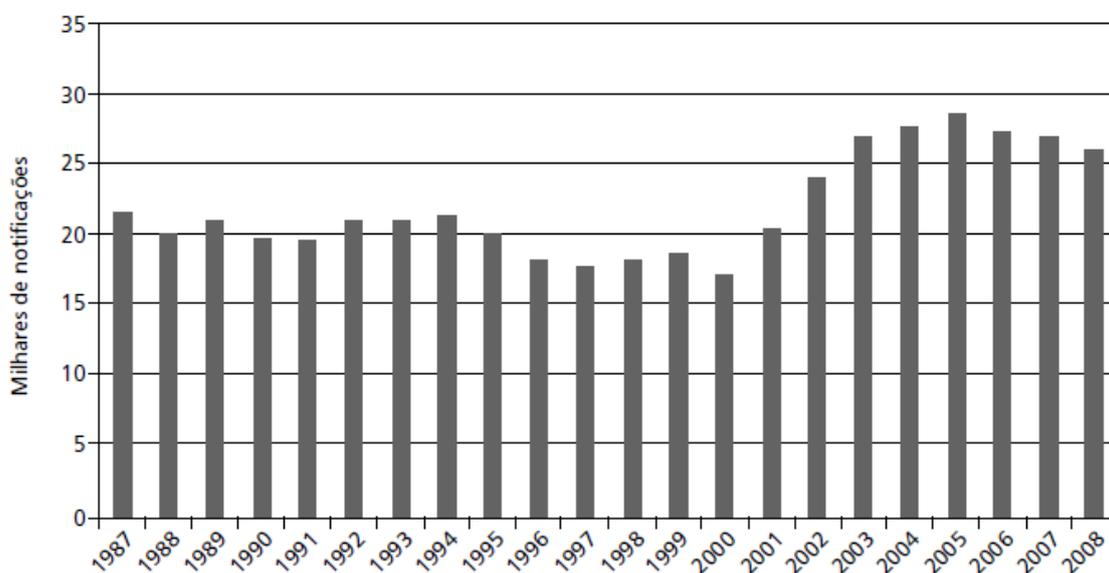


Figura 3: Incidência dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil, 1987 a 2008 (Ministério da Saúde, 2009).

Região	Nº casos	Incidência (por 100.000 habitantes)
Norte	8.065	52,6
Nordeste	6.865	13,2
Sudeste	6.689	8,3
Sul	3.071	11,1
Centro-oeste	2.215	16,4
Brasil	26.905	13,8

Figura 4: Incidência de acidentes ofídicos por regiões.(Ministério da Saúde, 2009).

Dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas, verifica-se o predomínio do acidente botrópico, dos casos de ofidismo notificados no país, seguidos do crotálico, laquétrico e elapídico, como pode ser visto na figura 5, havendo pequenas variações de acordo com a região e distribuição geográfica das serpentes.

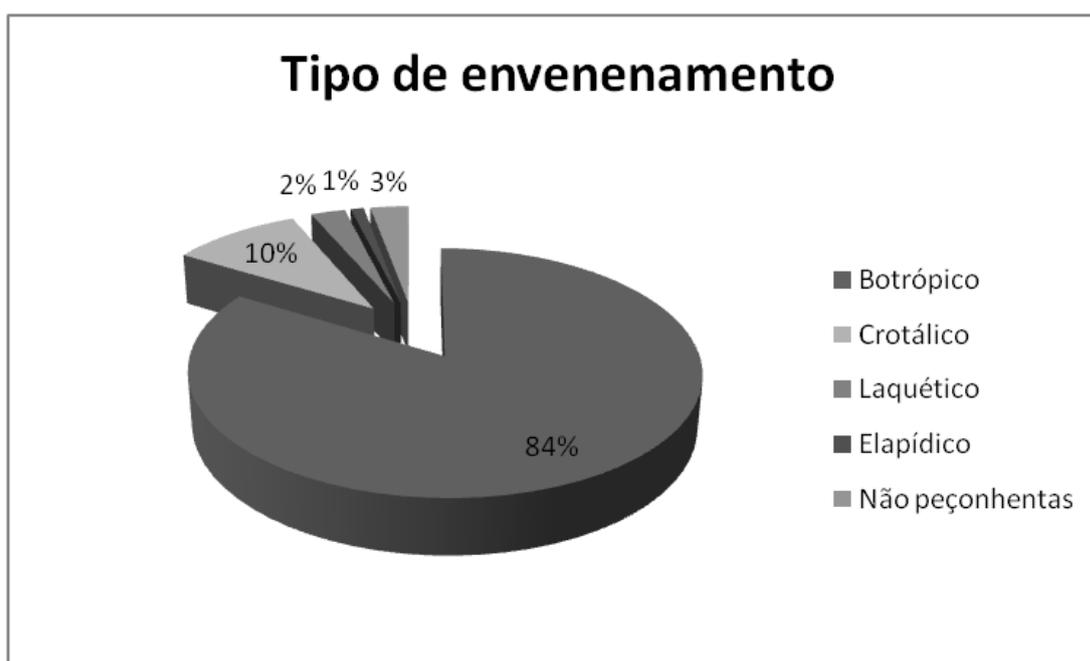


Figura 5: Ocorrência por tipo de envenenamento indicando predomínio dos acidentes botrópicos em todo o país, dados do Ministério da Saúde. (Ministério da Saúde, 2001).

A variação regional é bastante significativa, se comparado a região Sudeste com as Regiões Norte e Centro-oeste é possível verificar que existe de 7 a 2 vezes mais acidentes ofídicos nestas regiões respectivamente.

É importante ressaltar que, estes acidentes ocorrem predominantemente nas áreas rurais, principalmente adultos jovens do sexo masculino, mas existem diferenças regionais, ou seja, o ofidismo apresenta sazonalidade marcada pelo predomínio de casos nos meses quentes e chuvosos, constituindo-se em frequente agravo à saúde dos trabalhadores dessas regiões onde, em geral, o acesso aos serviços de saúde é precário. (França e Málaque, 2003).

Apesar do baixo índice de letalidade dos acidente botrópicos, esses têm grande importância em saúde uma vez que podem resultar em severas complicações locais gerando sequelas permanentes como perda de função ou amputação do membro afetado (Gutierrez *et al.*, 2007).

## **1.2 Principais atividades do veneno de *Bothrops jararaca***

Os venenos de serpente têm como seus componentes neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, fator de crescimento neural, lectinas, proteínas de ligação do fator de Von Willebrand (VWF), proteínas de ligação do fator IX/X, disintegrinas, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP – Bradykinin-potentiating peptides), peptídeos natriuréticos, várias enzimas (exemplo: proteases, fosfodiesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidase, catalase, ATPase, hialuronidase, entre outras) e também enzimas inibitórias (Matsui, Fujimura e Titani, 2000).

Considerando-se que os venenos são uma fonte abundante de material com variada atividade biológica, que são produzidos e armazenados em um ambiente altamente especializado, a glândula de veneno (Warrel, 1989), estes têm a principal função de paralisação da presa para obtenção de alimento e sua digestão. As várias enzimas inoculadas podem também dar início ao processo de digestão dos tecidos da presa e a sua morte é devido ao comprometimento no sistema respiratório ou circulatório causados por várias neurotoxinas, cardiotoxinas, fatores coagulantes e outros fatores que agem de forma isolada ou sinergicamente. Deste modo, o veneno contém substâncias destinadas a afetar processos vitais, atuando no sistema nervoso,

cardiovascular, locomotor, afetando a coagulação do sangue, a migração celular e a permeabilidade de membranas (Melgarejo, 2003).

A maior parte das toxinas de serpentes exibe suas atividades farmacológicas, no entanto, algumas proteínas de forma covalente ou não covalente formam complexos com outras proteínas para expor com mais potência suas atividades farmacológicas. Essas interações sinérgicas entre as proteínas do veneno são capazes de aumentar a potência letal do veneno de serpente (Kini, 1990; Doley e Kini, 2009).

Adicionalmente os venenos de serpentes e outras secreções tóxicas contêm um número significativo de substâncias farmacológicas ativas com um modo de ação específico. Nos venenos de serpentes da família *Viperidae* as proteínas podem ser hidrolases como as lectinas, desintegrinas e precursores de peptídeos bioativos (Kamigutti, 1991). Entre os peptídeos biologicamente ativos conhecidos encontram-se os peptídeos potenciadores de bradicinina, peptídeos natriuréticos, etc.

O estudo desses venenos tem propiciado a elucidação de diversos mecanismos farmacológicos. Dentre eles, é destacado o descobrimento da bradicinina e, posteriormente o peptídeo BPP<sub>5a</sub> que levou ao desenvolvimento do fármaco Captopril<sup>®</sup>, (Rocha e Silva et al., 1949) que é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA)(Ferreira, 1965).

Os envenenamentos causados pelas serpentes *Bothrops jararaca*, são caracterizados com fisiopatologia complexa incluindo danos teciduais rápidos e drásticos e manifestações sistêmicas (França e Málaque, 2003).

### **1.2.1 Atividade inflamatória aguda**

A atividade inflamatória aguda é causada por um conjunto de frações do veneno botrópico, bioquimicamente heterogêneas, com especificidades diversas, responsáveis pelos fenômenos locais.

O estudo sobre a atividade inflamatória tem evidenciado que após o envenenamento, os principais componentes mediadores da formação do edema induzido pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*, tem sido os derivados do ácido araquidônico (Trebien e Calixto, 1989; Perales et al., 1992; Gonçalves et al., 2000). Adicionalmente também foi demonstrado que o veneno

de *B. jararaca* induz aumento das concentrações de leucotrieno B<sub>4</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>, correlacionando o aumento destes mediadores ao acúmulo de células inflamatórias (Farsky et al., 1997).

Evidências mostram que vários mediadores endógenos participam do processo inflamatório induzido por veneno botrópico. Dentre eles, podemos citar componentes do sistema complemento, óxido nítrico e citocinas, como o TNF- $\alpha$ , interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-6 (Farsky et al., 2000; Zamuner et al., 2001; Moura-da-Silva et al., 1996; Rucavado et al., 2002). Esses mediadores podem agir em um ou em alguns tipos de células, terem vários alvos ou mesmo apresentar efeitos em diferentes tipos celulares, sendo uma vez ativados e liberados pelas células, a maioria desse mediadores têm uma meia-vida curta (Kumar et al., 2005).

Em resumo, segundo Cabral et al. (2005), o processo inflamatório inclui a liberação de substâncias pró- e antiinflamatórias pelo organismo afetado, na tentativa de regular o processo, retornando a homeostasia

### **1.2.2 Atividade sobre a coagulação e plaquetas**

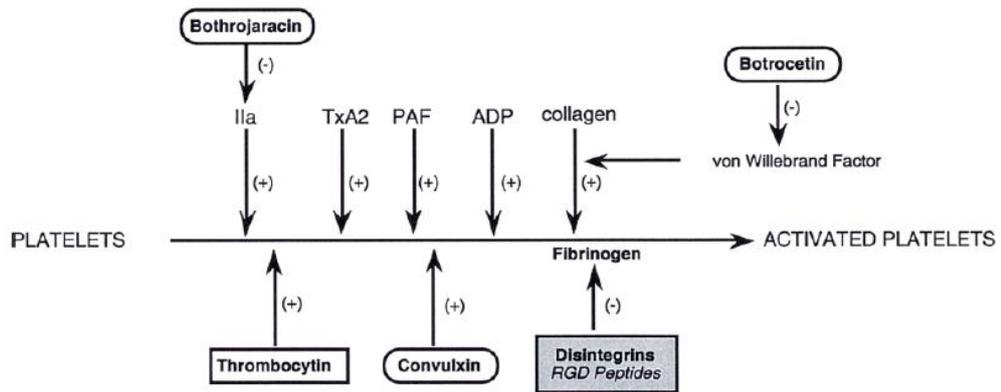
A atividade sobre a coagulação ocorre pelo fato do veneno botrópico possuir capacidade de ativar fatores da coagulação sanguínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo frequentemente, incoagulabilidade sanguínea. São descritos fatores com atividades sobre agregação e aglutinação plaquetária (França e Málaque, 2003).

A hemostasia envolve não somente a formação do coágulo, mas também sua dissolução, como pode ser visualizado na figura 6, os dois processos opostos estão em equilíbrio, mantendo as propriedades hemodinâmicas constantes (Braud et al., 2000).

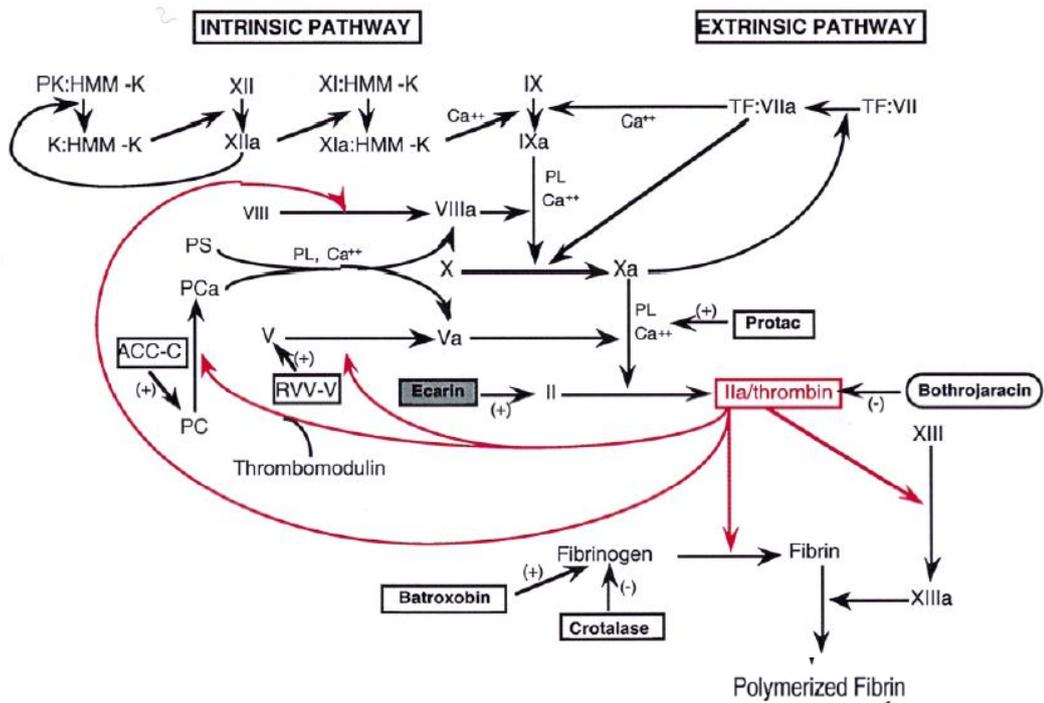
A injúria causada pelos venenos botrópicos, ativa, de modo isolado ou simultâneo, o fator X e a protrombina. Possuem também ação semelhante à trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. Essas ações produzem distúrbios da coagulação, caracterizados por consumo dos seus fatores, geração de produtos de degradação de fibrina em fibrinogênio, podendo

ocasionar incoagulabilidade sanguínea. Este quadro é semelhante ao da coagulação intravascular disseminada. Também podem levar a alteração da função plaquetária, bem como plaquetopenia (Kamigutti, 1991; Braud et al., 2000).

A



B



C

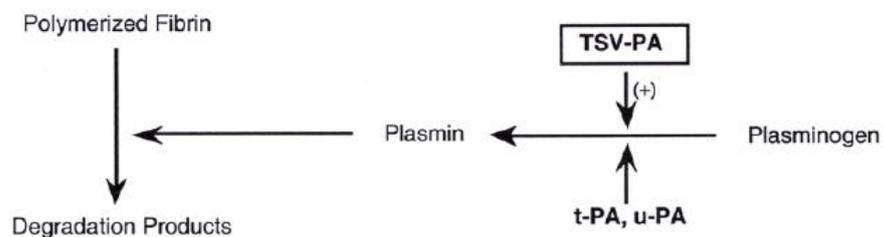


Figura 6: Os processos fisiológicos da hemostasia. Ação de várias famílias de proteínas do veneno nas três vias de hemostasia. A- Agregação plaquetária. B- Coagulação. C-Fibrinólise. As serinoproteases estão em caixas retangulares, lectinas do tipo C estão em caixas arredondadas, desintegrinas estão em cinza e ecarina é uma metaloprotease.Fonte: Braud et al.,2000.

### 1.2.3 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica é atribuída por componentes específicos, denominados hemorraginas, metaloproteinases que contém zinco. Sendo que essas hemorraginas podem romper a integridade do endotélio vascular e têm atividade de desintegrina, degradando vários componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo IV, fibronectina e laminina. Além disto, são potentes inibidores da agregação plaquetária (França e Málaque, 2003).

A inoculação do veneno de *B. jararaca*, em dose baixa, na bolsa escrotal de ratos, demonstram alterações importantes no tecido conjuntivo, tais como desestruturação de fibras colágenas próximas a vasos e feixes nervoso, desgranulação de mastócitos e hemorragia (Gonçalves e Mariano, 2009).

Embora a principal responsável pelo sangramento nos envenenamentos por viperídeos seja a ação das metaloproteinases, as alterações da coagulação podem contribuir para a hemorragia local e sistêmica. A maioria desses venenos tem enzimas coagulantes, sendo a mais comum a enzima tipo trombina, que atua diretamente sobre o fibrinogênio, produzindo microtrombos de fibrina e originando depleção dos níveis de fibrinogênio com consequente incoagulabilidade, contribuindo para a hemorragia (Matsui, Fujimura, Titani, 2000).

### 1.3 Composição do veneno

O veneno de *Bothrops jararaca*, contém uma grande quantidade e diversidade de proteinases, como a bothrombina, que tem atividade específica na coagulação (Nishida *et al.*,1994). PA-BJ é outra serinoprotease do veneno de *B. jararaca*, que foi isolada como uma enzima que induz à agregação plaquetária (Serrano *et al.*,1995). Portanto, venenos de serpentes da família *Viperidae* contêm uma grande variedade de enzimas proteolíticas que evoluíram por milhões de anos no sentido de adquirir alta especificidade e potência contra sistemas vitais de suas presas, sendo que, desempenham papel importante no quadro do envenenamento.

### 1.3.1 Complexos das proteases

Os venenos de serpentes, particularmente das famílias *Viperidae* e *Crotalidae*, contém proteases que afetam a cascata de coagulação sanguínea e ajudam na digestão das presas. Embora a maioria delas serem farmacologicamente ativas por si só, algumas exigem componentes adicionais para exibir uma atividade ideal (Kini, 1990, Doley e Kini, 2009)

#### 1.3.1.1 Metaloproteinasas:

As metaloproteinasas são enzimas abundantes em venenos de serpente da família Crotalines e Viperides. Elas são relevantes na fisiopatologia do envenenamento, sendo responsável pela ação local e sistêmica da hemorragia, freqüentemente observadas nas vítimas.

As SVMPs (*Snake Venom Metaloproteinase*), juntamente com as ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) e as ADAMTs (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*), compõem a subfamília M12B das metaloproteinasas, também conhecidas como reprotinas. Essas enzimas apresentam grande homologia no domínio metaloproteinase e em alguns casos, nos domínios localizados na porção carboxi-terminal subsequente (Fox; Serrano, 2008). As reprotinas fazem parte de uma superfamília de metaloproteinasas, conhecida como metzincinas, que também incluem as astacinas, MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) e serralisinas. As metzincinas são caracterizadas por sua dependência catalítica por íons metálicos, especialmente o zinco, e são amplamente expressas em eucariotos e procariotos (Bode, Gomis-Ruth, Stocker, 1993).

Assim, nos últimos anos, há um crescente esforço para compreender os mecanismos induzidos por SVMP responsável pela reação inflamatória e os determinantes estruturais do efeito (Teixeira *et al.*, 2005). Anteriormente as metaloproteinasas/desintegrinas isoladas dos venenos, eram agrupadas, em quatro classes estruturais, relacionadas de acordo com a presença de seus domínios, P-I, P-II, P-III e P-IV (Bjarnason e Fox, 1994; Hite *et al.*, 1994).

Recentemente Fox e Serrano (2008), propuseram uma classificação onde 11 classes e subclasses de SVMPs foram identificadas: P-Ia, P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId, P-IIe, D-I, P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIId.

A diversidade estrutural das SVMPs é muito grande e confere às mesmas a capacidade de interferir em diversos sistemas fisiológicos. Essas atividades dependem da presença de cada um dos domínios, organizados durante a biossíntese das SVMPs. Portanto, as metaloproteinases têm suas ações gerais não apresentando alta seletividade pelo substrato como as serinoproteases.

### **1.3.1.2 Serinoproteases**

As serinoproteases são enzimas proteolíticas com um único resíduo de serina ativo no seu sítio catalítico. Elas representam aproximadamente 0,6% de todas as proteínas do genoma humano (Yousef *et al.*, 2003).

As serinoproteases exibem preferência para catalisar a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a uma classe particular de aminoácidos. No grupo das enzimas semelhantes à tripsina, as proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo os aminoácidos básicos, arginina (Arg) e lisina (Lis), uma vez que elas têm um resíduo de aspartato ou glutamato no sítio de ligação do substrato, que pode formar uma forte ligação eletrostática com aqueles resíduos (Yousef *et al.*, 2003), assim como as serinoproteinases de mamíferos que regulam a hemostasia (Serrano e Maroun, 2005).

As serinoproteases desempenham um papel importante na regulação de muitos processos biologicamente relevantes, como por exemplo, a tripsina na digestão e a trombina na cascata da coagulação sanguínea. Esta classe de enzimas é um importante alvo na química medicinal contemporânea uma vez que, muitas doenças são decorrentes do mau funcionamento desta regulação. Assim, compostos que interagem especificamente com as serinoproteases podem ser úteis no tratamento de várias doenças (Talhout e Engberts, 2001).

A tripsina é uma das serinoproteases mais bem estudadas e caracterizadas; por isso, é uma das enzimas melhor compreendidas tanto na sua estrutura, especificidade como no seu mecanismo catalítico. Em virtude

disso, a tripsina é uma enzima utilizada como modelo experimental para estudos de caracterização de outras serinoproteases. A tripsina é uma enzima proteolítica com ampla especificidade com relação ao substrato. O seu centro ativo é constituído de um sítio aniônico, ao qual ligam-se substratos e inibidores, carregados positivamente; um sítio hidrofóbico, adjacente ao sítio aniônico, ao qual ligam-se substratos e inibidores, por suas cadeias hidrocarbonadas, e o sítio catalítico propriamente dito, que é constituído da tríade catalítica His57, Ser195 e Asp102 (Mares-Guia *et al.*, 1965). Ela catalisa a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo a carboxila terminal dos aminoácidos Arg e Lis nas proteínas (Craik *et al.*, 1985).

As serinoproteinases de venenos de serpentes (SVSPs – Snake Venom Serine Proteases) são enzimas que afetam o sistema hemostático, agindo em uma variedade de componentes da cascata de coagulação, do sistema fibrinolítico e do sistema calicreína-cininas das células, sendo capaz de provocar um desequilíbrio do sistema hemostático (Seegers e Ouyang, 1979; Markland, 1997; Pirkle, 1998).

Sendo assim, as serinoproteases podem agir sob substratos endógenos gerando compostos bioativos.

#### **1.4 Geração de compostos bioativos a partir de componentes presentes em venenos**

Os peptídeos bioativos podem ser obtidos através de proteínas adquiridas na alimentação (Kitts, 1994). Além da digestão, é possível obter peptídeos bioativos pela proteólise de macromoléculas endógenas (Richter *et al.*, 1999), de origem bacteriana, fungos e/ou através da ação de venenos animais, como de serpentes, vespas, anfíbios, entre outros.

Esses peptídeos encontram-se na forma inativa dentro das cadeias polipeptídicas das proteínas originais, chamadas de precursores peptídicos. Diversos resultados indicam que os fragmentos peptídicos gerados após a hidrólise dessas macromoléculas são capazes de atravessar as membranas biológicas, atingindo os tecidos periféricos, via circulação sistêmica, podendo apresentar ações específicas no local ou em sítios mais distantes, alterando o

metabolismo celular ou ainda, atuando como vasorreguladores, fatores de crescimento, liberadores de hormônios ou neurotransmissores (Roberts & Zagola, 1994).

A biossíntese de peptídeos bioativos envolve, entre outros processos, a ação de enzimas proteolíticas. Segundo Robert & Zagola (1994), esta classe de enzimas atua em processos vitais do organismo que podem ser:

- Gerais, como na nutrição, no reparo de estruturas somáticas, e;
- Específicas, em reações de agressão e defesa, onde a atividade proteolítica é capaz de desempenhar funções especializadas ou em cascata, neste caso é denominada proteólise limitada como, por exemplo, a cascata da coagulação ou a geração de peptídeos a partir de precursores.

Foi demonstrado (Murayama *et al*, 1997) que os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) encontram-se em uma proteína “precursora” no veneno de *Bothrops jararaca*, podendo ser considerado como um exemplo de “criptídeo precursor”. Os BPPs, inicialmente isolados e identificados no veneno da *Bothrops jararaca*, foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora da angiotensina (ECA) descritos, e constituem uma família de moléculas, cuja diversidade estrutural parece ser fundamental para determinar e modular a sua atividade biológica (Rioli *et al.*, 2008). A utilização de métodos de bioquímica associados à tecnologia de espectrometria de massas, para a análise de amostras de indivíduos ou de grupos de espécimes determinados, permite identificar novas estruturas destas moléculas até então desconhecidas. Além disto, o estudo farmacológico permite determinar que as atividades dos BPPs não se restrinjam à sua capacidade de inibição da ECA. Por fim, o uso das técnicas de biologia molecular, permitem a determinação da sequência da proteína precursora destes peptídeos, além de proporcionar ferramentas para a determinação da distribuição destes peptídeos em tecidos além da glândula de veneno da serpente. Além disso, podem possibilitar a identificação de seu correlato endógeno expresso em mamíferos, onde devem agir como peptídeos vasoativos.

Segundo Autelitano et al. (2006), há evidências crescentes de que a clivagem proteolítica dá origem a peptídeos “escondidos” com atividade biológica que são muitas vezes imprevisíveis e totalmente distinta da proteína “precursora”. Um amplo espectro de proteases tem sido implicadas na geração de cripteínas naturais, que parecem desempenhar um papel na modulação de diversos processos biológicos, tais como a angiogênese, função imune e crescimento celular. A liberação proteolítica das cripteínas com novas atividades, representa um mecanismo importante para a crescente diversidade da função da proteína e, potencialmente, oferece novas oportunidades para a terapêutica utilizando como base as proteínas.

Ueki et al. (2007), propôs que há um número não identificado de peptídeos funcionais na natureza, pelas seguintes razões: i) múltiplos fragmentos de peptídeos que são produzidos a partir de cada uma das proteínas precursoras de mensageiros peptidérgicos, que parecem ter várias atividades biológicas, ii) muitos fragmentos de peptídeos que são produzidos durante a maturação ou processos de degradação de proteínas funcionais, como enzimas mitocondriais e outras proteínas reguladoras, têm diversas atividades biológicas, muitas vezes distintas das proteínas “precursoras”. Esses peptídeos funcionais, são chamados de criptídeos, que estão “escondidos” em estruturas de proteínas.

## **1.5 Cripteínas**

As cripteínas são definidas como proteínas que não são consideradas precursoras específicas para peptídeos bioativos, mas são capazes de, sob certas condições, gerar peptídeos bioativos com propriedades fisiológicas relevantes (Pimenta e Lebrun, 2007).

Com isso, podemos citar como dois exemplos importantes; uma proteína precursora multifuncional a POMC (Próopiomelanocortina) que é capaz de gerar diversos peptídeos biologicamente ativos dependendo da forma pela qual é processada, e várias proteínas existentes no leite como a caseína e a lactoglobulina que são consideradas cripteínas (Ueki *et al.* 2007; Autelitano *et al.* 2006).

Existe também cripteínas que são derivadas da matriz extracelular, como o colágeno. Segundo Autelitano *et al* (2006), as cadeias  $\alpha$  do colágeno além de suas propriedades estruturais, têm sido, inequivocamente, demonstrado que contêm vários polipeptídeos críticos que podem ser liberados da matriz extracelular para atuar como moduladores da angiogênese e crescimento de células tumorais, como mostra a figura 7.

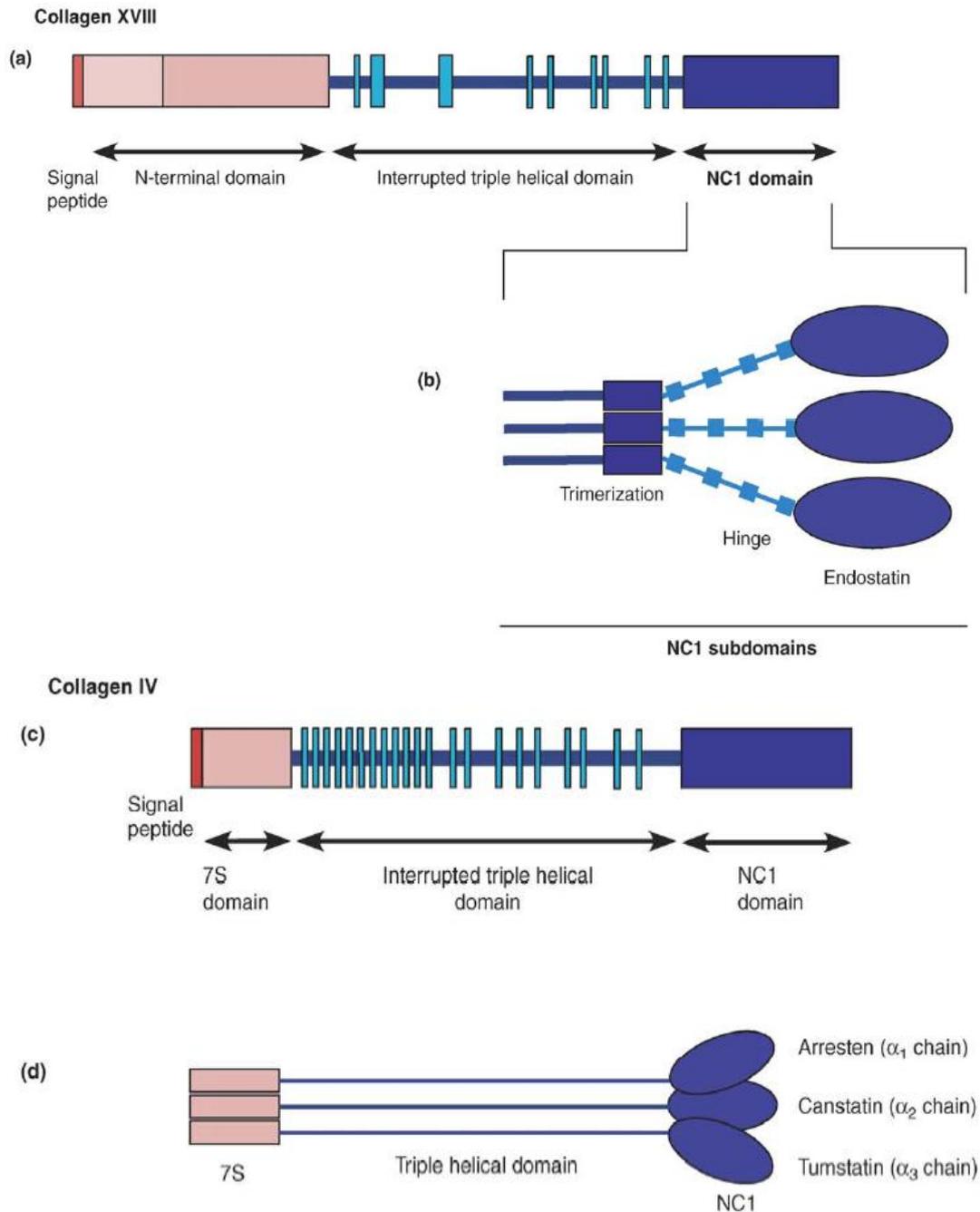


Figura 7: Domínios estruturais e peptídeos críticos de colágeno XVIII e colágeno IV de mamíferos. (a) Uma única cadeia de colágeno XVIII é composto por um domínio N-terminal, em domínio central composto por vários domínios helicoidais triplos e não colagenosos e um domínio C-terminal NC1. (b) O domínio NC1 do colágeno XVIII é composto de subdomínios, incluindo uma região responsável pela trimerização, uma dobradiça de domínio que é alvo de várias proteases e um componente anti-angiogênico, a endostatina, que pode ser liberado após a clivagem. (c) A estrutura linear de uma única cadeia de colágeno IV  $\alpha_1$  é retratado, mostrando o típico N-terminal do domínio 7S rico em cisteína, o domínio central helicoidal triplo interrompido por pequenas regiões não colagenosas e um domínio C-terminal globular NC1. (d) Feixes helicoidais triplos de colágeno tipo IV são montados através de uma interação entre os domínios NC1 e associação covalente do domínio 7S. Várias proteases podem atuar para liberar fragmentos críticos anti-angiogênico, como “canstatina, tumstatina e arresten”, a partir de domínios NC1 de várias cadeias. Fonte: Autelitano et al., 2006.

As cripteínas são classificadas em três tipos de classes (Autelitano et al., 2006). Essas classes se diferenciam pela sua funcionalidade e tipo de proteólise, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Classificação das cripteínas em três tipos

<b>Classes das cripteínas</b>	
Tipo 1	Clivagem proteolítica natural da proteína “mãe” gerando produtos com nova atividade biológica ou não relatada.
Tipo 2	Clivagem proteolítica natural da proteína “mãe” gerando produtos com atividade biológica similar a molécula “mãe”, mas com mudanças nas suas propriedades.
Tipo 3	Geração de fragmentos de proteínas-peptídeos <i>in vitro</i> com atividades biológicas novas. Fragmentos idênticos ou similares não precisam, necessariamente, serem gerados naturalmente.

Fonte: Autelitano et al, 2006.

### 1.6 Proteínas consideradas cripteínas

Já existem diversas proteínas que, atualmente, estão sendo consideradas como cripteínas, tendo também suas funções descritas. A figura 8 mostra as principais proteínas endógenas que tem gerado peptídeos bioativos com propriedades biológicas relevantes enquanto que a figura 9 revela a possível correlação evolutiva entre estas proteínas o que sugere que estas proteínas têm desempenhado este papel ao longo da evolução e que esta “função” analogamente a diversas outras proteínas tem se conservado.

Protein name	Accession number	UniRef 90 cluster	Peptide/cryptide function	Notation
Angiotensinogen	P01019	12	VC	ANGT_HUMAN
Atrial Natr. Peptide	P01160	8	HO	ANF_HUMAN
Beta-amyloid <sup>a</sup>	P05067	28	?	A4_HUMAN
Calcitonin	P01258	2	HO	CALC_HUMAN
Casein (bovine)	P02662	9	AMP	CASA1_BOVIN
Casein $\alpha^a$	P47710	11	PEI, HYP, AMP, AT and OP	CASA1_HUMAN
Cytochrome C <sup>a</sup>	P99999	13	AMP	CYC_HUMAN
Collagen $\alpha$ -1(XV) <sup>a</sup>	P39059	5	HO	COFA1_HUMAN
Collagen $\alpha$ -1(XVIII) <sup>a</sup>	P39060	6	HO	COIA1_HUMAN
Collagen $\alpha$ -3(IV) <sup>a</sup>	Q01955	15	HO	CO4A3_HUMAN
Creatine kinase M <sup>a</sup>	P06732	24	VC	KCRM_HUMAN
Fibronectin <sup>a</sup>	Q59EH1	6	HO	Q59EH1_HUMAN
Glucagon	P01275	24	HO	GLUC_HUMAN
Hemoglobin $\alpha^a$	P69905	33	HYP, BPP, OP, PEI, ANG, AMP and HR	HBA_HUMAN
Hemoglobin $\beta^a$	P68871	52	HYP, BPP, OP, PEI, ANG, AMP and HR	HBB_HUMAN
Histone H1 <sup>a</sup>	P07305	10	AMP	H10_HUMAN
Immunoglobulin $\gamma$ -chain <sup>a</sup>	P01857	3	HO	IGHG1_HUMAN
Insulin	P01308	9	HO	INS_HUMAN
Kininogen	P01042	7	HO and HYP	KNG1_HUMAN
Lactalbumin <sup>a</sup>	P00709	5	HO and AMP	LALBA_HUMAN
Lactoferrin <sup>a</sup>	P02788	13	PEI and HYP	TRFL_HUMAN
Lactoglobulin <sup>b</sup>	P02755	15	OP and PEI	LACB_BUBBU
Myoglobin <sup>a</sup>	P02144	13	AMP	MYG_HUMAN
Neurotensin	P30990	8	HO	NEUT_HUMAN
Oxytocin/vasopressin	P01178	6	HO	NEU1_HUMAN
Peptide YY	P10082	5	HO	PYY_HUMAN
POMC	P01189	13	HO	COLI_HUMAN
Prolactin	P01236	11	HO	PRL_HUMAN
Proline-rich protein	P04280	4	AMP	PRP1_HUMAN
Protachykinin 1	P20366	16	HO	TKN1_HUMAN
Serum albumin <sup>a</sup>	P02768	9	OP	ALBU_HUMAN
Snake BPPs precursor <sup>c</sup>	Q9PW56	3	BPP and HO	BNP2_BOTJA
Trypsin <sup>d</sup>	P07477	15	-	TRY1_HUMAN
Urotensin	O95399	2	HO	UTS2_HUMAN
Vasointestinal pep.	P01282	4	HO	VIP_HUMAN

Figura 8: Peptídeos humanos clássicos e precursores crípticos, sendo: AMP: peptídeo antimicrobiano; HYP: hipotensivo; VC: vasoconstritor; OP: opioide; BPP: peptídeo potenciador de bradicinina; PEI: inibidor de enzima proteolítica; ANG: analgésico; HR: liberador de hormônio; AT: antitrombótico; HO: hormonal. <sup>a</sup> Cripeínas; <sup>b</sup> Proteína bovina, não encontrada em humanos; <sup>c</sup> Proteína de serpente; <sup>d</sup> Proteína de controle.

Fonte: Pimenta e Lebrun, 2007.

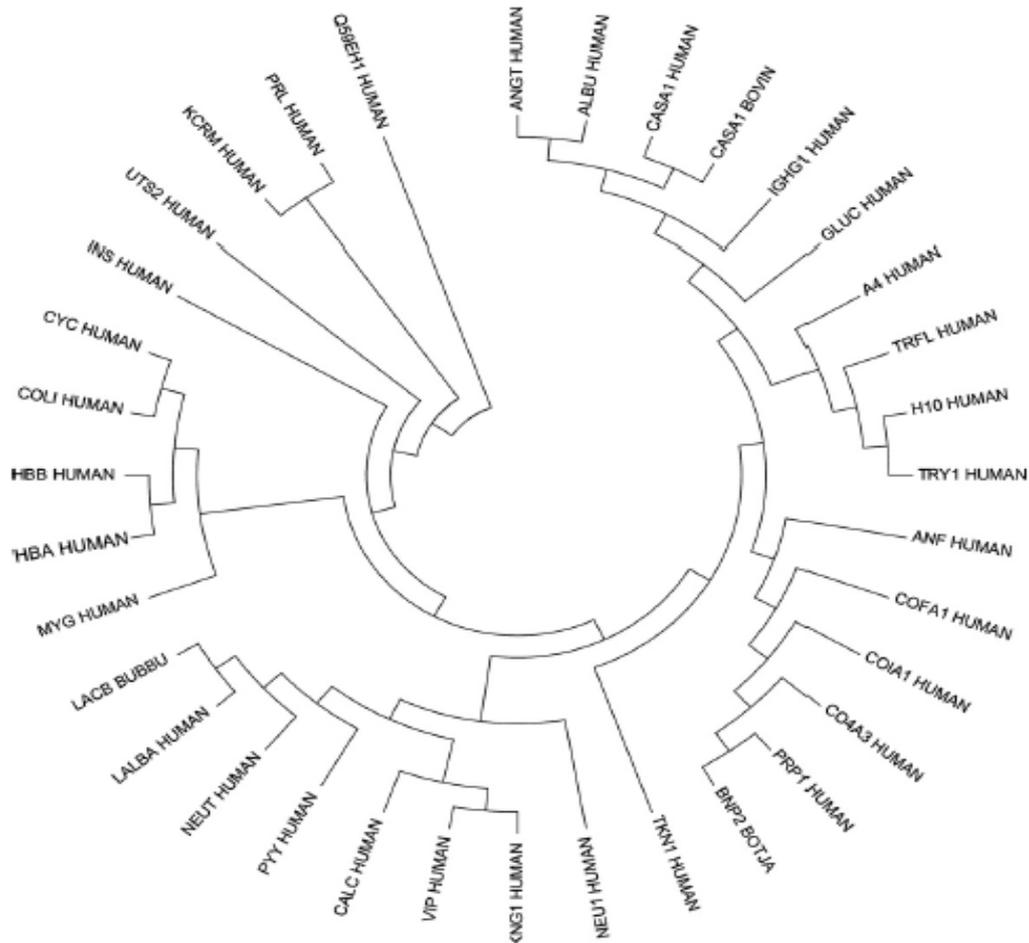


Figura 9: Possível correlação evolutiva das cripteínas, árvore críptica (Pimenta e Lebrun, 2007).

Baseado nesta nova classificação das proteínas, foi observado quais os principais tecidos afetados pela picada e foram escolhidos os substratos que estão mais envolvidos nos acidentes ofídicos. Lembrando também de sua função no organismo, por sua localização nos tecidos e órgãos, e também por serem alvos primários da ação das enzimas presentes nos venenos botrópicos. Para os testes realizados no presente, foram selecionados a partir dos criptídeos descritos (Figura 8 e 9), aqueles que estão localizados na superfície (Colágeno), na musculatura (Mioglobina), na circulação (Hemoglobina) e também a porção Fc da cadeia pesada da Imunoglobulina G (Fc IgG).

A atuação de proteases exógenas como as de venenos, bactérias ou proteases tóxicas sobre proteínas endógenas pode ter importância na geração de peptídeos que podem atuar como sinalizadores nos processos fisiológicos do indivíduo analogamente aos peptídeos bioativos gerados a partir dos precursores endógenos.

Baseado neste conceito avaliou-se até que ponto proteínas endógenas são passíveis de sofrer a ação de proteases como no caso do envenenamento e, após sua digestão gerarem peptídeos bioativos que poderiam atuar sobre o hospedeiro de forma indireta, acarretando efeitos não relacionados aos componentes do veneno e ainda não descritos.

Desta forma além das ações próprias do veneno, neste trabalho será possível verificar principalmente se as enzimas proteolíticas presentes no veneno da *Bothrops jararaca* são capazes de gerarem compostos ativos sobre a ação de componentes endógenos, o que explicaria, em parte, a ineficácia da neutralização dos anticorpos contidos no soro antitoxinico para algumas ações encontradas no envenenamento.

Em constatação, as principais enzimas contidas no veneno de *Bothrops jararaca*, que são capazes de gerar peptídeos bioativos são as metaloproteases e as serinoproteases. Devido as serinoproteases serem mais específicas, estas foram utilizadas neste trabalho.

## 2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a geração de peptídeos bioativos a partir de proteases do veneno de *Bothrops jararaca* sobre substratos endógenos para melhor compreender o fenômeno do envenenamento.

Sendo assim, os objetivos específicos são:

1. Isolar as serinoproteases do veneno total de *Bothrops jararaca*.
2. Identificar o melhor tempo de hidrólise.
3. Isolar os possíveis peptídeos bioativos provenientes das hidrólises.
4. Sequenciar e sintetizar os peptídeos.
5. Caracterizar bioquimicamente os peptídeos e verificar as propriedades biológicas desses em cultura de células.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Veneno**

Neste trabalho foi utilizada uma mistura de 10 mg de veneno total de *Bothrops jararaca*, de animais adultos, na forma liofilizada obtido da Seção de Venenos do Instituto Butantan.

##### **3.1.2 Células**

Foram utilizadas neste trabalho, linhagens de células do tipo Fibroblastos Humanos Normais (FN-1) (ATCC PCS-201-012) e Células Endoteliais (Human Umbilical Vein Endothelial Cell - HUVEC's) (ATCC PCS-100-010). Estas células foram, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

##### **3.1.3 Lista de reagentes**

- ✓ Tripsina comercial (Sigma Aldrich);
- ✓ Solução de bicarbonato de amônio 0,2 M pH 8,1 (Merck);
- ✓ Colágeno tipo I (Sigma Aldrich);
- ✓ Mioglobina de cavalo (Calbiochem);
- ✓ Hemoglobina de cavalo (Sigma Aldrich);
- ✓ Porção Fc da cadeia pesada da imunoglobulina G (Seção de produção de soros e vacinas do Instituto Butantan);
- ✓ Solução de Tris HCl 50 mM pH 8,0 (Sigma Aldrich);

- ✓ Solução de ácido acético 0,1 N (Vetec);
- ✓ Solução de 0,1% de ácido Trifluoroacético (TFA) (Sigma Aldrich);
- ✓ Solução de 90% de acetonitrila (ACN) (J.T.Baker) com 10% de solução de 0,1% de TFA;
- ✓ Meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab);
- ✓ Soro fetal bovino inativado (Cultilab);
- ✓ Solução tripsina/EDTA 250 mg% (1:250) (Cultilab);
- ✓ Solução de MTT [3 -(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difenil tetrazolio brometo] (5 mg/mL) (Sigma Aldrich);
- ✓ Álcool Metílico (Synth);
- ✓ Solução de Bowin;
- ✓ Solução de ácido pícrico;
- ✓ Solução de HCl 0,01 M;
- ✓ Solução de NaOH 0,1 M;
- ✓ Soroalbumina bovina (Sigma Aldrich);
- ✓ Reagente de Bradford (Biorad);
- ✓ Tampão de amostra:
  - 350 mM de Tris/HCl;
  - 10% de SDS;
  - 30% de glicerol;
  - 1,2 mg de azul de bromofenol;
  - 9,3% de 2-mercaptoetanol.
- ✓ Azul de Coomassie R-250;
- ✓ Solução de EDTA 10 mM (Reagen);
- ✓ Tampão fosfato 100 mM pH 7,4;
- ✓ Ácido tricloroacético (TCA) 5%;
- ✓ Solução 1% de caseína (Merck);
- ✓ Benzoil-Arginil-p-nitroanilida (BAPNA) (Sigma Aldrich);
- ✓ Solução de 0,01 M de ácido clorídrico (HCl);
- ✓ Solução de 0,1 M de NaOH;
- ✓ Padrão de massa molecular (Sigma Aldrich).

### 3.1.4. Lista de equipamentos

- ✓ pHmetro Jenway 3510;
- ✓ coluna Protein Pak Glass (200 SW) 8 x 300 mm (Waters);
- ✓ CLAE (Hewlett Packard), série 1100, com injetor manual, detector UV variável, bomba binária;
- ✓ Banho-maria (Cientec);
- ✓ Espectrofotômetro (Ultrospec III, Pharmacia-Biotech);
- ✓ Coluna C18 fase reversa;
- ✓ Aparelho de seqüenciamento automático, PPSQ-21A (Shimadzu);
- ✓ Aparelho de síntese de peptídeo automatizado (Shimadzu);
- ✓ Centrífuga (Sorvall Super speed RC2-B);
- ✓ Banho-seco (Accu block Digital Dry Bath, Labnet).

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Isolamento de Serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca*

Para o isolamento das serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca* foi realizada uma cromatografia por exclusão molecular de acordo com Ponce-Soto (2007) com modificações. O procedimento foi realizado utilizando 10 mg do veneno total de *Bothrops jararaca* dissolvido em 400 µL de solução de bicarbonato de amônio 0,2 M com pH 8,1 e essa solução final do veneno dissolvido foi centrifugada por 2 (dois) minutos e o sobrenadante sendo reservado para aplicação no CLAE, que foi estabilizado com água ultra pura (Milli-Q) e depois com a solução de bicarbonato de amônio 0,2 M pH 8,1. Depois de estabilizado a coluna e a lâmpada UV à 280 nm, ressaltando que a coluna permaneceu refrigerada em banho de gelo, foi então injetado 320 µL da amostra, contendo 8 mg do veneno total. A análise da amostra foi programada para ter um tempo total de 145 minutos com 100% da concentração da solução de bicarbonato de amônio 0,2 M pH 8,1, com pressão máxima de 30 bar, fluxo

de 0,3 mL/minutos, sendo monitorado no comprimento de onda de 280 nm e as frações foram coletadas no intervalo de 2 minutos, liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Esse procedimento foi realizado por 5 (cinco) vezes para obtenção da quantidade necessária de serinoproteases.

### **3.2.2 Dosagem de proteínas**

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A soroalbumina bovina (BSA) foi utilizada como padrão de referência. As amostras foram incubadas com 200 µL do reagente de Bradford por 5 minutos a temperatura ambiente. Logo após, a densidade óptica foi medida em um espectrofotômetro com comprimento de onda à 595 nm e a concentração de proteínas calculada a partir de uma curva padrão com BSA, utilizando o programa GraphPad InStat 3.

### **3.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS**

As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Laemmli, 1970). As amostras foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra (350 mM de Tris/HCl; 10% de SDS; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol; 9,3% de 2-mercaptoetanol) e fervidas em banho seco por 5 minutos. O material foi então aplicado em um gel de empacotamento de 5% e gel de resolução de 15% de poliacrilamida e submetido à eletroforese com corrente constante de 110 volts. Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250 e também com nitrato de prata. Da mesma maneira também foi utilizado um gel de resolução de 12,5% de poliacrilamida.

### **3.2.4 Atividade proteolítica das frações isoladas do veneno de *Bothrops jararaca***

Para determinação da atividade proteolítica das frações isoladas do veneno de *Bothrops jararaca* foi utilizado o método de Kunitz (1947) modificado por Lomonte & Gutierrez (1983). As amostras foram incubadas previamente com 100 µL de solução de EDTA 10 mM, com 1 mL de caseína 1% em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, durante 30 minutos a 37 °C. Após 30 (trinta) minutos foi adicionado 1 mL ácido tricloroacético (TCA) 5%, posteriormente submetidos à centrifugação a 23.500 g, durante 15 minutos sendo a densidade óptica dos sobrenadantes determinada em espectrofotômetro Ultrospec III, Pharmacia-Biotech a 280 nm. Para determinar a atividade proteolítica das frações isoladas também foi realizado o mesmo experimento, mas utilizando uma caseína com fluoróforo (leitura com excitação à 365 nm e emissão à 525 nm) e também foi utilizado Benzoil-Arginil-p-nitroanilida (BAPNA) (leitura à 410 nm).

### **3.2.5 Hidrólise dos substratos endógenos**

Os substratos foram hidrolisados utilizando a enzima tripsina (T), ou a mistura contendo as serinoproteases isoladas do veneno total de *B. jararaca* (pSPBJ – *pool* serinoproteases *Bothrops jararaca*). Para a hidrólise foi pesado 2 mg do substrato endógeno e dissolvido em solução de Tris/HCl 50 mM pH 8,0. O tubo contendo essa solução adicionado o substrato foi colocado no banho maria à 37 °C e então adicionado a enzima de escolha, sendo que a tripsina foi adicionada em uma concentração de 100 µg e a mistura das serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 200 µg. Antes de adicionar as serinoproteases no tubo com o substrato endógeno, foi adicionado 100 µL de solução de EDTA 10 mM, para inibir as metaloproteinases que poderiam gerar uma hidrólise não desejada. Em seguida, as amostras permaneceram em banho maria por 18 e 36 horas, para T ou pSPBJ, respectivamente. Esse tempo foi pré-estabelecido levando-se em

conta a cinética de hidrólise. Esta cinética de hidrólise, que determinou o melhor tempo para geração de peptídeos, foi realizada coletando alíquotas das amostras incubadas seguindo os seguintes tempos: 0 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas e 24 horas. Essas alíquotas foram analisadas de acordo com seu perfil cromatográfico.

### **3.2.6 Precipitação dos hidrolisados**

Depois da hidrólise de 18 e 36 horas, os hidrolisados foram precipitados utilizando a solução de ácido acético 0,1 N, em banho de gelo, obedecendo a relação volume: volume (v:v), e 30 (trinta) minutos depois os hidrolisados foram centrifugados, em uma ultra centrifuga SORVAL refrigerada à 4 °C, por 1 (uma) hora à 7.600 g, e o sobrenadante foi coletado e liofilizado, o precipitado foi descartado.

### **3.2.7 Purificação dos peptídeos obtidos pela hidrólise dos substratos endógenos**

Uma alíquota da amostra hidrolisada e já precipitada foi injetada no CLAE para análise, sendo que o aparelho já estava programado para uma análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B, monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18, fase reversa. Os picos gerados foram coletados, liofilizados e armazenados a -20 °C. Esse procedimento foi realizado mais de uma vez para obter a quantidade necessária de material.

### **3.2.8 Sequenciamento de peptídeo**

Após a purificação dos peptídeos pelo método de CLAE, esses peptídeos foram analisados pela Dra. Isabel de Fátima Correia Batista e ao Dr. Rafael Marques Porto, laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, para serem submetidos ao sequenciamento por degradação de Edman. Pehr Edman estabeleceu um método para marcar o aminoácido N-terminal e clivá-lo sem romper as ligações peptídicas entre os outros aminoácidos. A degradação de Edman remove sequencialmente um aminoácido por vez da extremidade amínica do peptídeo. Esse peptídeo reage com fenilisotiocinato que se combina com o grupo amino do N-terminal, levando esse peptídeo à tratamento com ácido diluído em baixas temperaturas onde ocorre a remoção do resíduo N-terminal, que pode ser identificado por cromatografia. O restante da cadeia será submetida a outra série destas reações, permitindo a identificação do novo resíduo N-terminal. Assim a sequência pode ser determinada (Edman, 1950).

### **3.2.9 Síntese de peptídeos**

Os peptídeos, depois de seqüenciados, foram submetidos à síntese, que foi realizada pelo Dr. Robson de Mello, no Laboratório do CAT/CEPID do Instituto Butantan. A síntese foi feita pelo método de fase sólida, utilizando um sintetizador automático, empregando a estratégia Fmoc. Essa estratégia é um processo pelo qual as transformações químicas podem ser realizadas em suporte sólido a fim de preparar uma vasta gama de compostos sintéticos (Merrifield, 1963).

### **3.2.10 Cultura de células**

As células foram cedidas pelo Dr. Durvanei Augusto Maria, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. As células foram distribuídas em placas e foram levadas para a incubadora a uma atmosfera de 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> e examinadas ao microscópio invertido, 3 vezes por semana.

O meio de cultura foi trocado neste mesmo intervalo de tempo. Ao atingirem a confluência, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>. Ao atingirem a confluência nesta nova garrafa foi desprezado o meio da garrafa e adicionado 2 mL de tripsina 0,4% para remover as células da superfície da garrafa. A tripsina foi retirada depois das células se soltarem e assim adicionou-se o meio RPMI com soro fetal bovino (SFB). As amostras de células foram transferidas para um tubo e esse foi centrifugado à 270 g, por 10 minutos em centrifuga refrigerada à 5 °C. Depois de centrifugado o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 10 mL de meio RPMI. Após homogeneização, a concentração de células foi ajustada para  $2 \times 10^5$  células por placa.

### **3.2.11 Teste de viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio brometo]. Este método é baseado na redução do MTT a cristais de formazan pelas células vivas. Foi determinada a atividade proliferativa das suspensões das linhagens celulares, incubadas em placas de 96 poços. Foram adicionados 10 mL de MTT (5 mg/ml) às células, e estas incubadas por três horas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período, o meio foi removido e acrescentou-se 100 mL de álcool metílico para dissolver os cristais de formazana formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm. Através deste ensaio colorimétrico foi avaliada a atividade proliferativa do composto nas linhagens celulares, e a determinação matemática pela equação da reta para a definição da melhor concentração proliferativa (Wilson,2000; Mosman, 1983).

### **3.2.12 Quantificação de produção de colágeno pelos peptídeos bioativos por espectrofotometria com Picrosirius red**

Inicialmente foram preparadas soluções de colágeno tipo I bovino (Sigma®) em PBS. A solução mãe de colágeno foi preparada na concentração de 1 mg/mL e realizada a curva padrão (1) nas seguintes concentrações: 300; 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6 µg/mL e a curva padrão (2) nas concentrações: 160; 80; 60; 40; 20; 10 e 5 µg/mL.

Como controle do meio de cultura o procedimento também foi realizado com colágeno diluído em RPMI (10% de SFB) a mesma utilizada nas culturas de fibroblastos e HUVEC's.

Após a adição de 50µL de cada uma das diluições de colágeno em placas de 96 poços de fundo chato em quadruplicata as placas foram secas em estufa a 37 °C *overnight*. Após 24 horas as culturas foram fixadas com 200 µL de solução saturada de bowin por 1 hora preparada no momento de sua utilização. O fixador foi removido cuidadosamente de cada poço e adicionado 300 µL de água destilada e remoção dos precipitados. As placas foram secas à temperatura ambiente durante 2 horas e acrescentado 200 µL do corante picrossírius-red diluído em solução saturada de ácido pícrico por 1 hora, sob leve agitação, ao abrigo da luz. Removido o corante cuidadosamente em bomba de vácuo por sucção, lavados com 250 µL de ácido clorídrico (HCl) a 0,01 M para remoção do corante não aderido. Após a adição de 150 µL da solução da NaOH a 0,1 M em cada poço sob agitação por 30 minutos. O corante aderido foi eluído. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 nm. Os valores médios foram plotados e construído um gráfico de dispersão com as concentrações conhecidas de colágeno com os valores do eixo X e as densidades óticas correspondentes a cada concentração com os valores do eixo Y e calculado a equação da reta e o coeficiente de correlação R<sup>2</sup>.

A determinação da quantificação da produção de colágeno das amostras foi baseado na curva padrão.

### **3.2.13 Análise por bioinformática**

Com os peptídeos obtidos foi feito uma análise utilizando três tipos de software de bioinformática, um para avaliar as características bioquímicas dos peptídeos (Programa Hidropathicity Plots, disponibilizado pelo site <http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>), outro software para análise das possíveis regiões de clivagem da proteína (Peptide Cutter, disponibilizado no site <http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/>) e foi utilizado o programa de modelagem, Cn3D que é um software de livre acesso, obtido pelo site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>), com esse programa foi feita a localização dos peptídeos na molécula íntegra de mioglobina.

## **4 Resultados**

#### 4.1 Isolamento de serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca*

Nesta primeira etapa, foi realizada uma CLAE, por exclusão molecular, com tempo total de 145 minutos, onde a mistura do veneno total de *Bothrops jararaca* foi fracionado, com o objetivo de isolar a mistura contendo as serinoproteinases (pSPBJ). A coleta foi realizada a cada 2 minutos. As frações foram agrupadas seguindo a seguinte ordem: fração I (tempo 60 a 65), fração II (65 a 72), fração III (72 a 90), fração IV (90 a 99), fração V (99 a 105), fração VI (105 a 126) e fração VII (126 a 145), como pode ser visto na figura 10.

Para obter a quantidade necessária de material, foram realizados 5 procedimentos de isolamento para a coleta das frações.

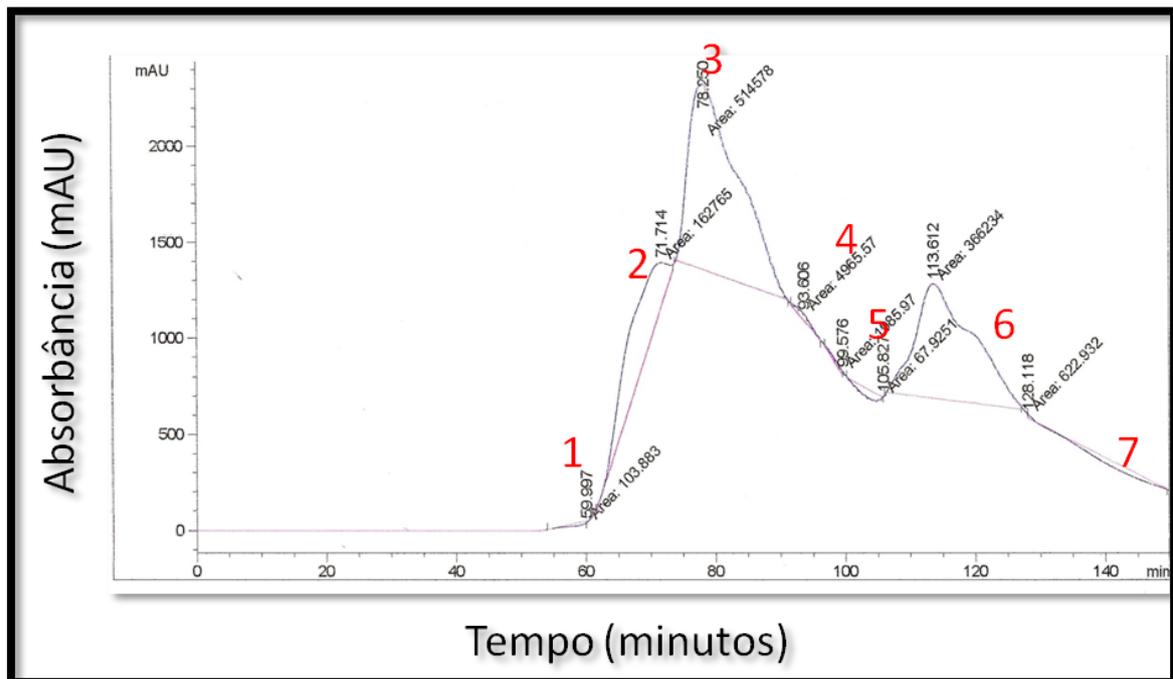


Figura 10: Cromatograma obtido por CLAE, mostrando as frações coletadas, correspondente da mistura de serinoproteinases provenientes do veneno total de *Bothrops jararaca*, onde foram obtidas 7 (sete) frações, indicadas pelos números em vermelho, pelas linhas rosa observa-se as áreas das frações coletadas, mostrando começo e fim do pico em relação a fração. Esse cromatograma foi obtido a 280 nm, utilizando uma coluna de exclusão molecular, equilibrada e eluída com solução de bicarbonato de amônio 0,2 M pH 8,1, por 145 minutos com fluxo de 0,3 mL/minuto.

Posteriormente, essas frações foram analisadas em eletroforese (SDS-PAGE 15%), para avaliar a massa molecular das proteínas contidas nas frações coletadas, como pode ser visualizado na figura 11.

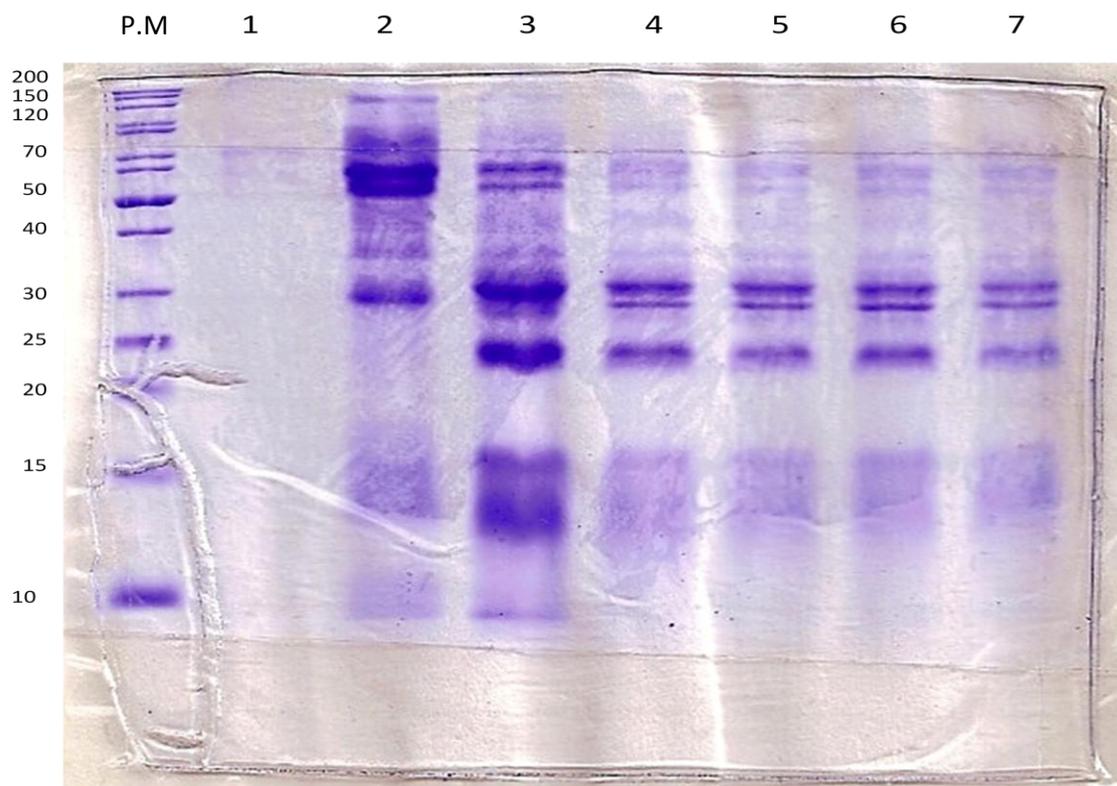


Figura 11: Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie R-250 mostrando as frações obtidas do veneno total de *Bothrops jararaca*. 1- Marcador de massa molecular – Fermentas. 2- Fração 1 proveniente do isolamento de serinoprotease. 3- Fração 2. 4- Fração 3. 5- Fração 4. 6- Fração 5. 7- Fração 6. 8- Fração 7.

Foi observado por SDS-PAGE 15%, a presença de contaminações entre as frações coletadas, mas sendo possível verificar a diferença entre as frações 2 e 3, onde na fração 2 observa-se uma banda mais concentrada entre 50 kDa a 120 kDa e na fração 3 uma banda concentrada entre 20 kDa a 40 kDa. A partir da fração 4 observa-se que essas bandas que aparecem mais fortemente coradas permanecem aparecendo nas outras frações coletadas. Para saber qual destas frações era a de interesse, no caso pSPBJ, avaliamos subsequentemente a atividade proteolítica das frações.

#### 4.2 Atividade proteolítica das frações isoladas do veneno de *Bothrops jararaca*

A atividade proteolítica das frações obtidas por CLAE, foi avaliada utilizando diferentes substratos, com o intuito de localizar a fração de interesse, pSPBJ.

Primeiro, para avaliar se as frações coletadas apresentavam atividade, foi feito o teste de atividade proteolítica utilizando uma caseína acoplada a um fluoróforo, sendo testadas todas as frações (I à VII). Este teste mostrou que todas as frações testadas apresentavam atividade proteolítica. Entretanto, foi observado que a fração II e III, apresentaram uma atividade maior, como mostra a figura 12.

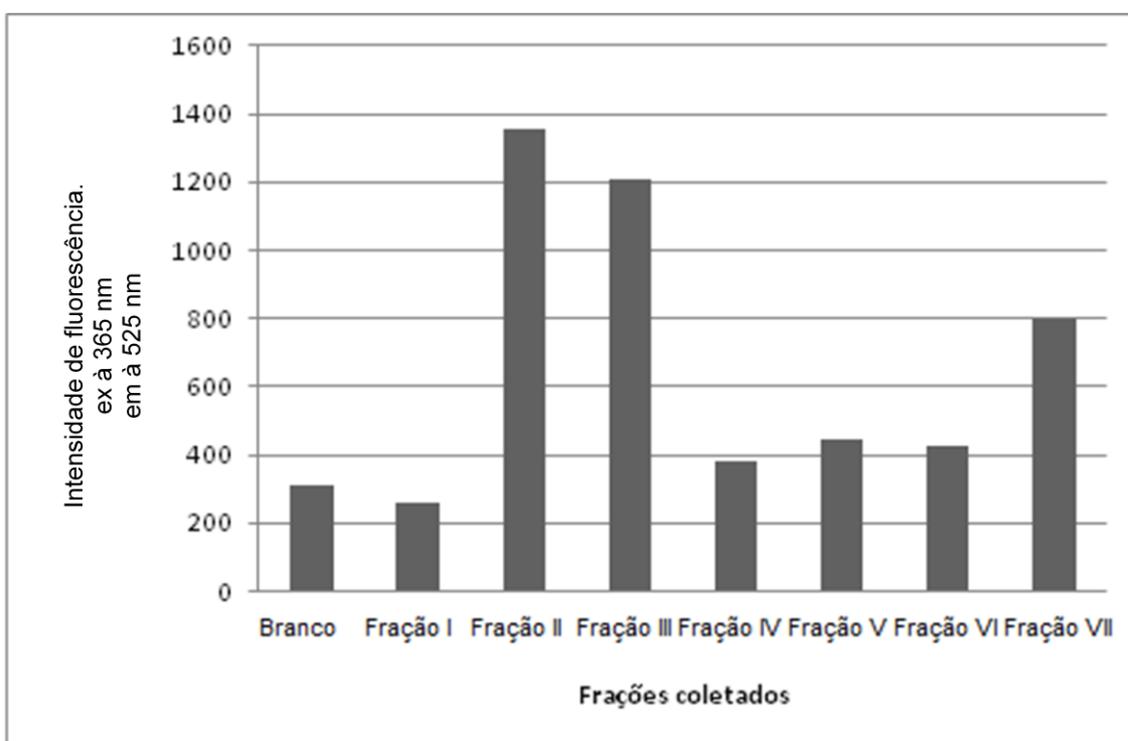


Figura 12: A atividade proteolítica das frações obtidas do fracionamento do veneno total de *Bothrops jararaca* por CLAE.

Com as frações que revelaram maior atividade proteolítica, fração II e III, foi realizado outro teste de atividade proteolítica, utilizando caseína 1%, para observar se as frações coletadas reproduziam os resultados anteriores. Então, de acordo com as bandas resultantes da eletroforese SDS-PAGE 15% e com os resultados anteriores, foram selecionados para este teste as frações II e III, que apresentaram maior atividade proteolítica e também a fração IV, pois observando o gel de SDS-PAGE 15% é visto que esta fração tem menos contaminantes, portanto foi testada, no intuito de poder utilizá-la.

Com as frações já determinadas, foram incubadas com caseína e solução de Tris 0,1 M pH 8,0. Para controle foi feito um branco, onde foi colocado água ultra pura (Milli-Q) com caseína 1% e solução Tris 0,1 M pH 8,0, nas mesmas condições, estas foram incubadas em tempos determinados. Assim, foi visto quais frações coletadas tinham atividade proteolítica, confirmando o teste anterior, como mostra a figura 13.

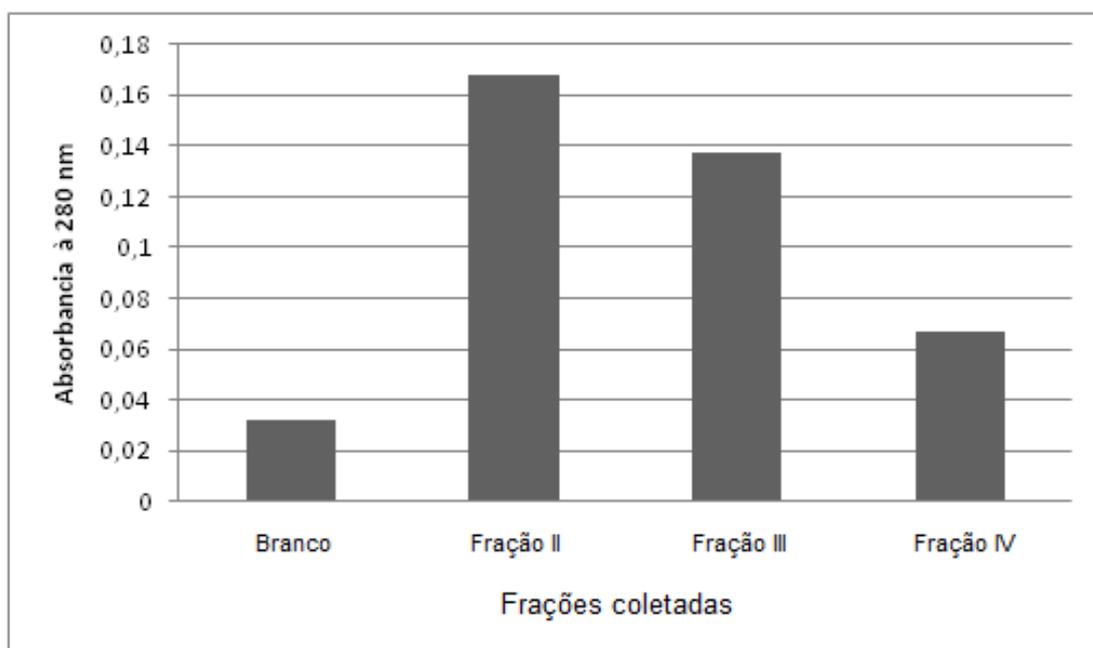


Figura 13: A atividade proteolítica das frações obtidas por CLAE do veneno total de *Bothrops jararaca*, utilizando como substrato caseína 1%.

Posteriormente foi realizado o teste de atividade proteolítica, utilizando caseína 1%, mas na presença de EDTA para inibir a atividade das metaloproteases, que podem estar presentes nas frações coletadas, assim evitando ações não desejadas. Portanto, neste ensaio foi visto que nas duas frações, fração II e III, houve uma redução na atividade proteolítica, indicando a inibição das metaloproteases. Na figura 14 é possível notar que a densidade óptica que é referente à atividade proteolítica, tem uma diminuição maior na fração II, assim indicando que a fração II tem mais metaloproteases do que serinoproteases, quando comparado à fração III.

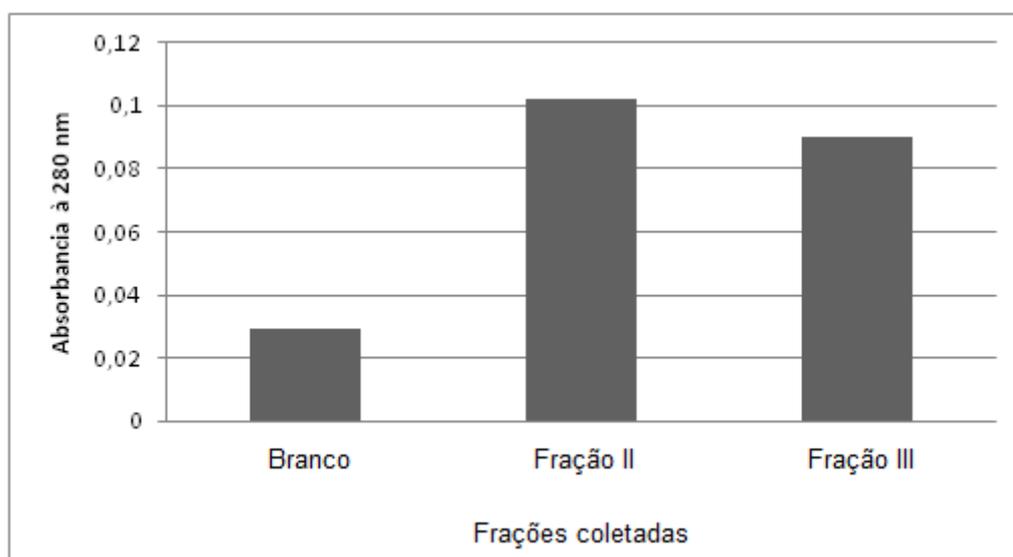


Figura 14: A atividade proteolítica das frações obtidas por CLAE, do veneno total de *Bothrops jararaca*, utilizando como substrato a caseína 1% na presença de EDTA.

Visto que houve uma diminuição da atividade proteolítica quando colocado EDTA, e essa diminuição foi maior na fração II, foi feito o teste de atividade proteolítica utilizando BAPNA, substrato específico para serinoproteases, onde foram colocadas as amostras e adicionado BAPNA, e em intervalos de 10 minutos foi lida a densidade óptica à 410 nm. Com este teste de atividade proteolítica foi visto que a fração III continha as serinoproteases, pois neste teste na fração II não houve atividade, já a fração III apresentou atividade, pois somente as serinoproteases são capazes de clivar o substrato BAPNA como mostra a figura 15.

Estes testes de atividade proteolítica foram feitos de forma pontual, somente uma vez, só para descartar as frações que continham as metaloproteases. Determinado que a fração III era a que continha as

serinoproteases, e que estas estavam ativas, foi realizado a hidrólise dos substratos utilizando a fração III que passou a ser chamada de pSPBJ.

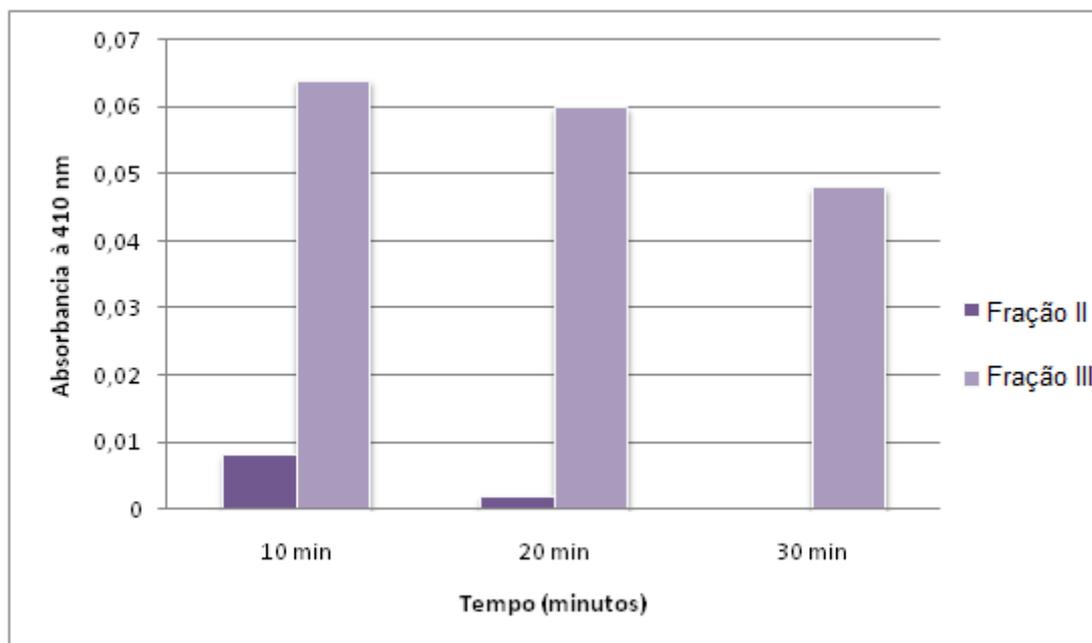


Figura 15: A atividade proteolítica utilizando BAPNA, um substrato que as metaloproteinasas não são capazes de clivar. Observa-se que a fração II não teve atividade sobre o substrato BAPNA diferente da fração III, que teve atividade proteolítica.

### 4.3 Hidrólise dos substratos endógenos

Antes de hidrolisar as proteínas (substratos) escolhidas com o pSPBJ, foi feita a hidrólise desses substratos (mioglobina, hemoglobina, colágeno tipo I, porção Fc da cadeia pesada da IgG) utilizando a tripsina como controle, sendo que a tripsina é uma enzima da classe das serinoproteinasas. Após os testes com a tripsina foi então utilizado o pSPBJ. Assim, foram incubados os substratos com tripsina, inicialmente para determinação do melhor tempo de hidrólise dos substratos

Depois de feita a hidrólise, foi realizada a precipitação das proteínas remanescentes utilizando ácido acético 0,1 N, e os peptídeos obtidos foram purificados por CLAE.

Feito a precipitação, o sobrenadante foi liofilizado e então utilizado o método de Bradford para observar a quantidade de peptídeos presentes, como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Concentração estimada das amostras hidrolisadas, determinado por Bradford.

Substrato	Concentração ( $\mu\text{g}$ )
Mioglobina	28,76
Porção Fc da cadeia pesada da IgG	48,64
Colágeno	5,93
Hemoglobina	22,47

Os hidrolisados também foram observados por eletroforese em gel SDS-PAGE 15%, corado por nitrato de prata, como mostra a figura 16. No gel foi aplicado 0,06  $\mu\text{g}$  da hidrólise de colágeno com T, 0,22  $\mu\text{g}$  de hemoglobina com T, 0,48  $\mu\text{g}$  de IgG com T e 0,3  $\mu\text{g}$  de mioglobina com T. As amostras foram aplicadas no gel em concentrações diferentes pois o volume total destas amostras eram pequenos e foi somente uma averiguação se a hidrólise tinha ocorrido da forma esperada.

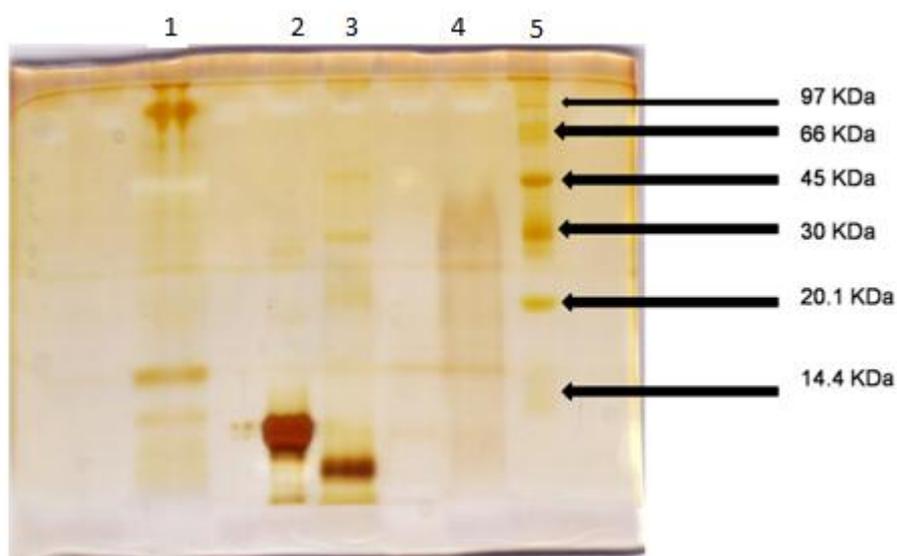


Figura 16: Gel de SDS-PAGE 15%, corado com nitrato de prata mostrando a hidrólise dos substratos pela tripsina. 1- Hidrólise do substrato IgG. 2- Hidrólise mioglobina. 3- Hidrólise hemoglobina. 4- Hidrólise colágeno. 5- Marcador de massa molecular – Sigma.

Baseado nas bandas de baixa massa molecular que são vistas neste gel de SDS-PAGE, é possível afirmar que a hidrólise foi realizada com sucesso e gerou fragmentos de baixa massa molecular, os peptídeos, pois sabendo as massas moleculares das proteínas antes da hidrólise que são: mioglobina (17 kDa); hemoglobina (cada cadeia 16 kDa); colágeno (193 kDa) e Fc IgG (45 kDa).

Para fazer uma comparação também foi feito uma eletroforese SDS-PAGE 12,5%, utilizando as proteínas antes da hidrólise, em duas diferentes concentrações. A figura 17 mostra as bandas das proteínas antes da hidrólise, podendo confirmar, em comparação com a figura 16, que a hidrólise ocorreu com sucesso, pois é possível visualizar as bandas referentes a massa molecular de cada proteína íntegra.

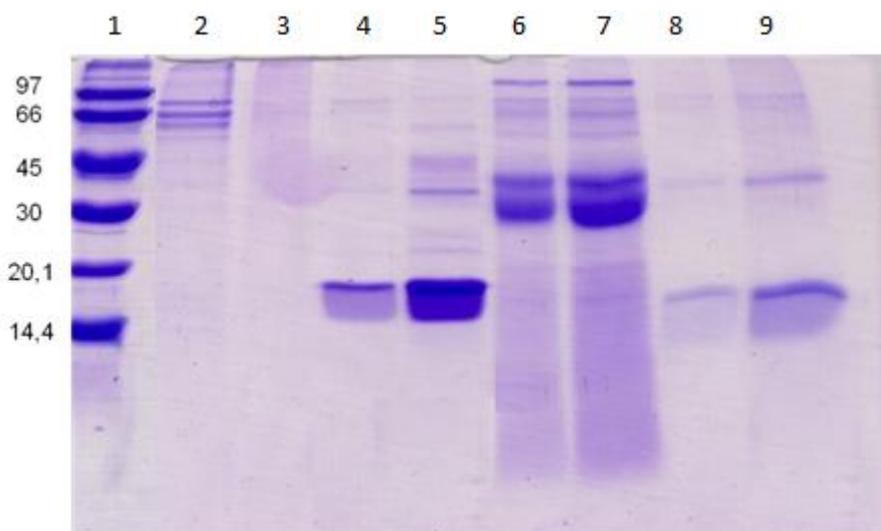


Figura 17: Gel de SDS-PAGE 12,5%, corado com azul de Coomassie R-250, mostrando as proteínas íntegras, antes da hidrólise. 1- Marcador de massa molecular – Sigma. 2- Colágeno 10 µg. 3- Colágeno 5 µg. 4- Mioglobina 5 µg. 5- Mioglobina 10 µg. 6- Fc IgG 5 µg. 7- Fc IgG 10 µg. 8- Hemoglobina 5 µg. 9- Hemoglobina 10 µg.

#### 4.4 Determinação do tempo ideal de incubação para a hidrólise dos substratos

Após a incubação dos substratos com tripsina durante o tempo determinado, as amostras foram submetidas à precipitação, para posteriormente ser analisada e determinar o melhor tempo para cada amostra, utilizando CLAE para avaliar o rendimento e a qualidade da hidrólise destes substratos.

Foi investigado o melhor tempo de hidrólise para cada substrato, realizando a cinética com tempo máximo de hidrólise de 24 horas. Nesse período, foram coletadas alíquotas de 100  $\mu$ L nos tempos determinados, sendo: 0 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas e 24 horas. Essas alíquotas foram analisadas por CLAE, observando o perfil dos cromatogramas.

As figuras 18, 19, 20 e 21, mostram os perfis desses hidrolisados utilizando como enzima a tripsina, no tempo de 18 horas. Esta determinação do melhor tempo foi padronizada utilizando os substratos com tripsina.

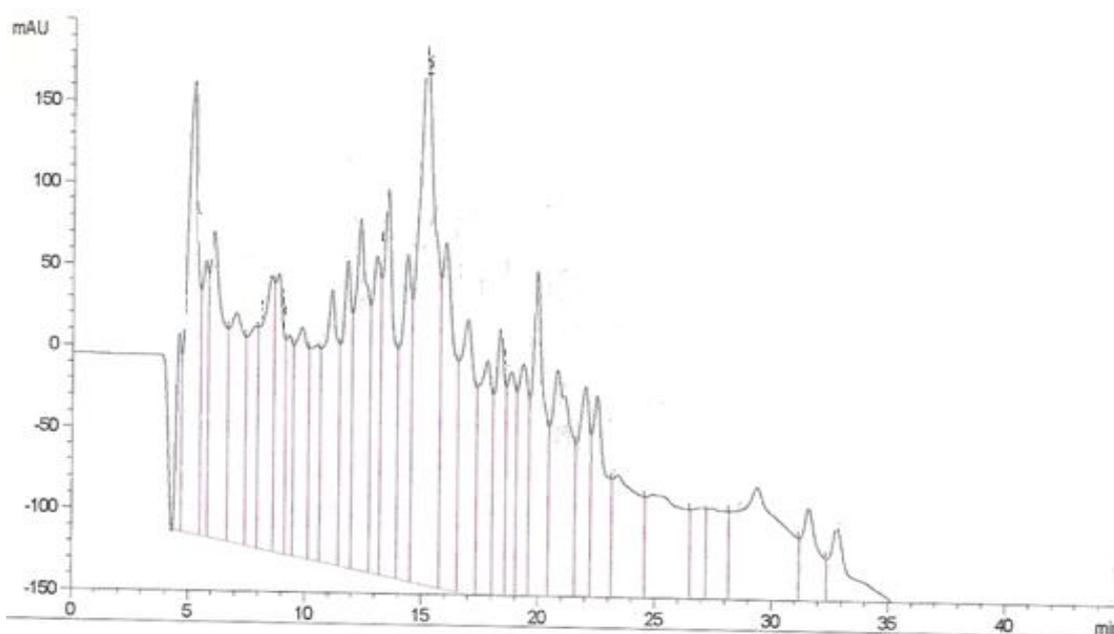


Figura 18: Cromatograma do hidrolisado de mioglobina com T, por 18 horas. Análise feita em 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% de ACN com 10% de solução 0,1% de TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18fase reversa.

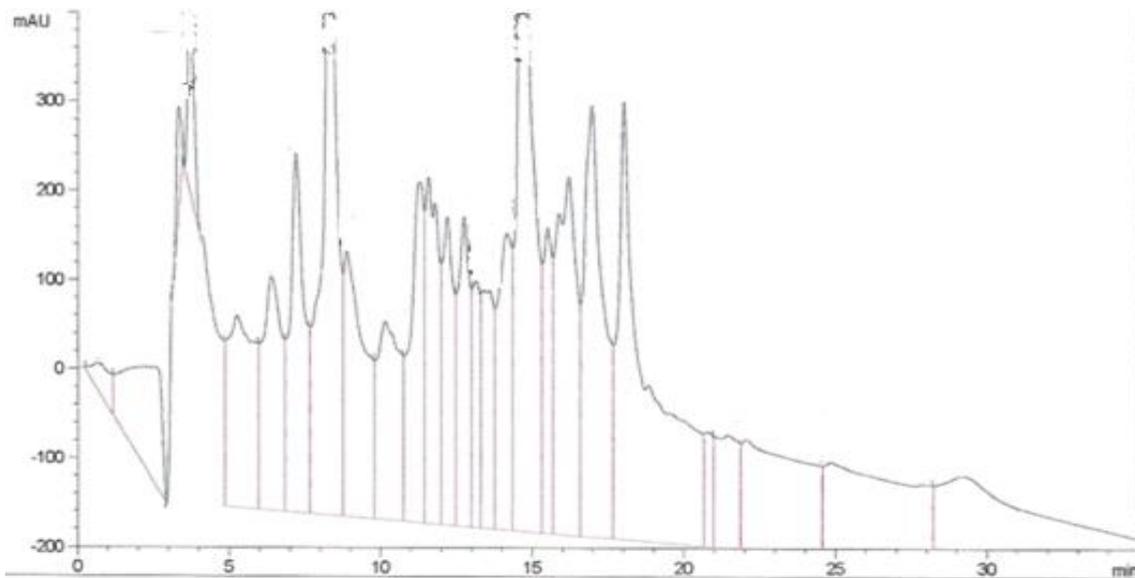


Figura 19: Cromatograma do hidrolisado de hemoglobina com T, por 18 horas. Análise feita em 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% de ACN com 10% solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa

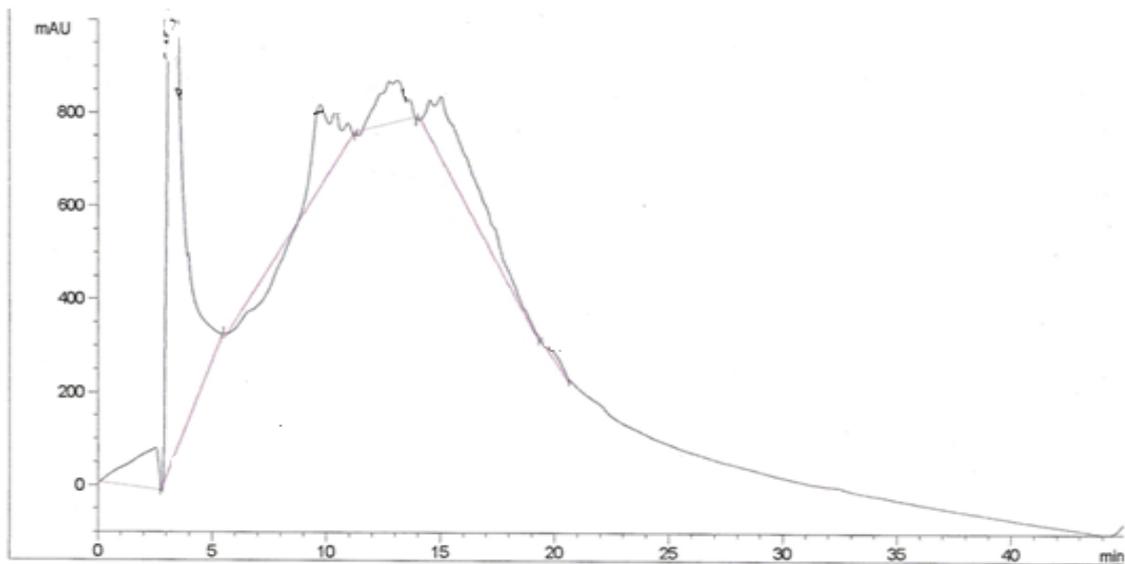


Figura 20: Cromatograma do hidrolisado da porção Fc da cadeia pesada da IgG com T, por 18 horas. Análise feita em 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% de ACN com 10% de solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa.

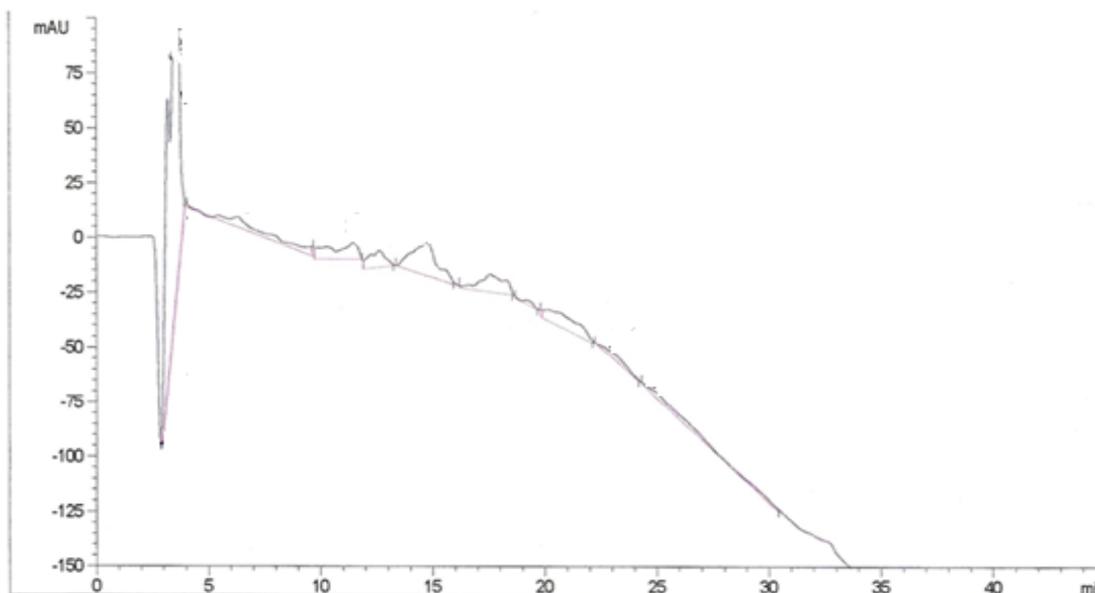


Figura 21: Cromatograma do hidrolisado de colágeno com T, por 18 horas. Análise feita em 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% de ACN com 10% de solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa.

#### **4.5 Isolamento e caracterização dos compostos obtidos através da hidrólise da mioglobina com tripsina**

Estabelecido o tempo de hidrólise, sendo de 18 horas, os peptídeos gerados foram separados utilizando CLAE. Primeiro esses peptídeos foram separados por frações e avaliados quanto sua atividade em cultura celular.

##### **4.5.1 Isolamento das frações obtidas do hidrolisado de mioglobina com tripsina**

Feito a hidrólise da mioglobina com tripsina durante 18 horas e esse hidrolisado, já precipitado, foi purificado utilizando CLAE.

Primeiro o hidrolisado foi coletado em frações, conforme mostra a figura 22.

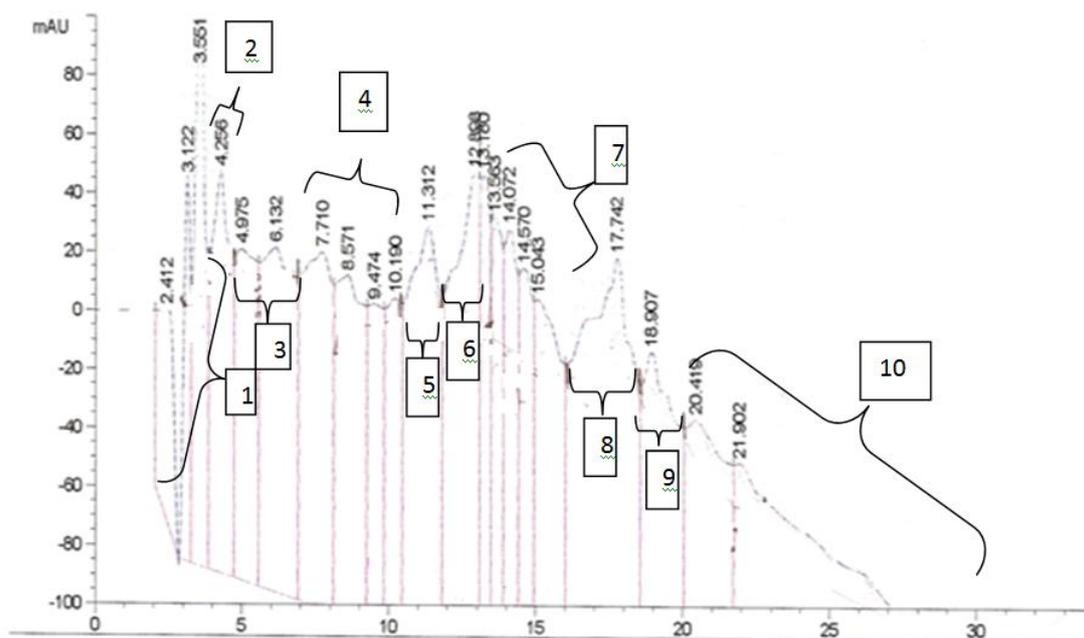


Figura 22: Coleta das frações do hidrolizado de mioglobina com T, utilizando o cromatograma obtido por CLAE, com uma análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B, monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa.

#### 4.5.2 Teste de viabilidade celular (Fn1) com as frações da hidrólise de mioglobina com tripsina

Essas frações coletadas foram testadas em cultura de células, linhagem fibroblastos humanos normais (Fn1), onde foram incubadas, por 24 horas. Após esse período foi verificada a viabilidade celular utilizando a técnica de MTT. Com esta técnica foi analisado a viabilidade celular e assim consequentemente a proliferação celular, com base na porcentagem do crescimento celular de acordo com o composto aplicado. Como controle foi utilizado somente as células. Essas foram incubadas durante o mesmo período somente com meio de cultura.

A técnica de MTT foi empregada para um teste preliminar, com o intuito de verificar quais frações obtidas após a digestão da mioglobina com a tripsina alterariam o crescimento celular.

Com isso, pôde ser visualizado que as frações peptídicas do hidrolizado de mioglobina com tripsina induziram atividade proliferativa. De acordo com esta atividade proliferativa foram determinadas algumas frações para serem

repurificadas e retestadas para confirmar sua atividade proteolítica e assim identificar novos peptídeos. As frações escolhidas foram, VI, VII e VIII, do hidrolisado de mioglobina com tripsina, que apresentaram um pouco mais de atividade proliferativa neste teste, como pode ser visto na figura 23.

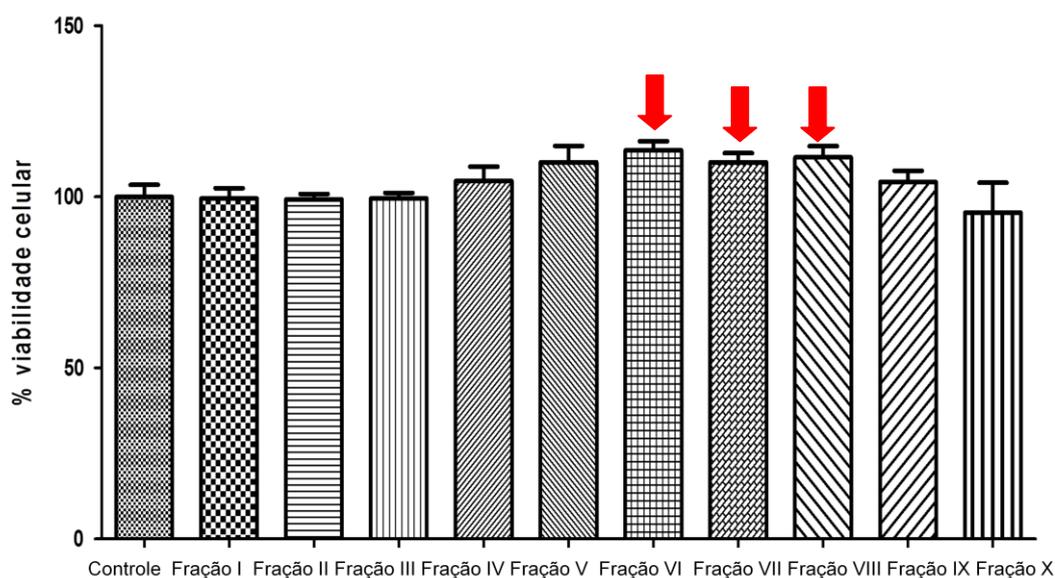


Figura 23: Teste de viabilidade celular utilizando a técnica de MTT com as frações do hidrolisado da mioglobina com T. As setas demonstram que as frações que tiveram maior atividade proliferativa e que foram escolhidas para novos experimentos.

#### 4.5.3 Purificação dos peptídeos

Após a confirmação das frações com maior atividade, utilizou-se o mesmo princípio da técnica de MTT e a mesma metodologia, foi possível determinar que a fração VIII tinha um maior rendimento na purificação, visto que na atividade proliferativa as diferenças entre as frações não eram muito significativas. Esta fração, VIII, foi submetida novamente a etapa de purificação, utilizando CLAE. Nesta nova etapa de purificação foram coletados os picos referentes a fração VIII, como mostra a figura 24.

Esses picos coletados serão testados e seqüenciados para caracterizar novos peptídeos, sendo que estes, depois de coletados foram liofilizados e armazenados a -4 °C.

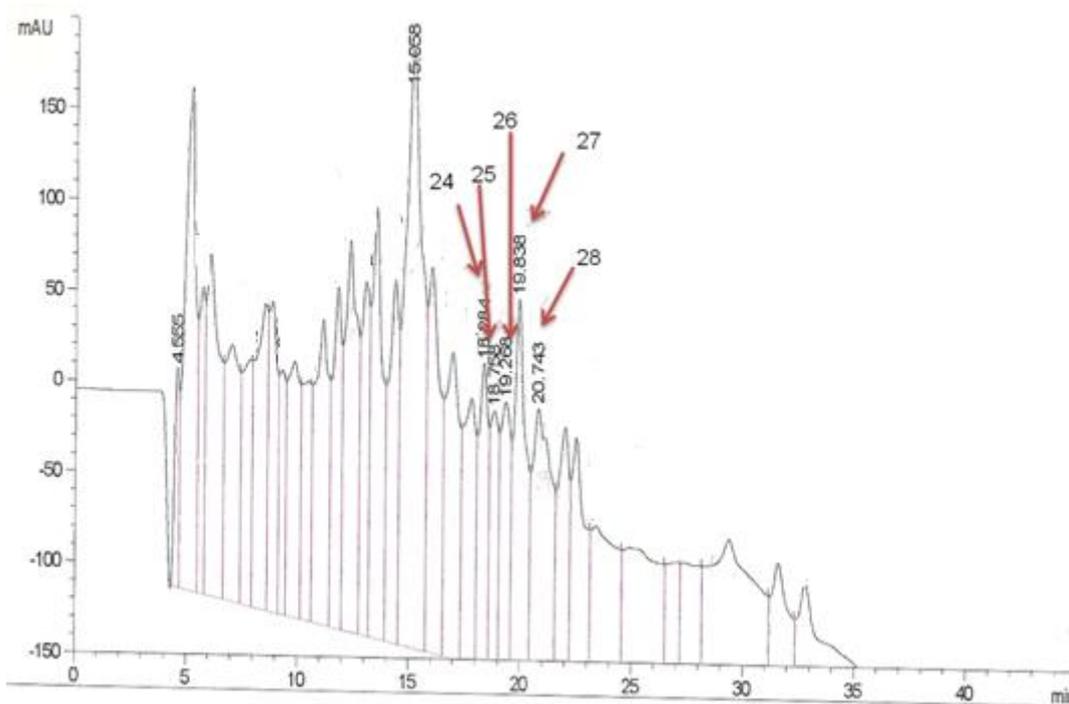


Figura 24: Cromatograma do hidrolisado de mioglobina com T, por 18 horas. Análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% de ACN com 10% de solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa. Este cromatograma mostra a coleta dos picos referentes à fração VIII, da hidrólise de mioglobina com T, podendo visualizar pelas setas, quais são os picos coletados e seus respectivos números.

#### 4.5.4 Sequenciamento de peptídeo

Após os picos purificados, estes foram submetidos ao sequenciamento de peptídeo por degradação de Edman, para determinar sua sequência de aminoácidos e assim poder fazer também a localização desses peptídeos na estrutura da proteína íntegra.

Pela degradação de Edman, foi observado a sequência dos peptídeos proveniente da hidrólise da mioglobina com T por 18 horas, sendo que foram obtidos a sequência de 3 peptídeos (tabela 3). Sendo que o peptídeo referente ao pico 25 e ao pico 26 não foram sequenciados, por não haver quantidade suficiente de material.

Tabela 3: Sequência, obtida por degradação de Edman, dos peptídeos gerados pela hidrólise da mioglobina com T.

<b>Pico da hidrólise de mioglobina com T</b>	<b>Sequência do peptídeo</b>
<b>Pico 24</b>	TGHPETLEK
<b>Pico 27</b>	GLSDGEWQQVLNVWGK
<b>Pico 28</b>	ALELFR

Obtido as sequências dos peptídeos foi então analisado as características bioquímicas, como mostrado na tabela 4.

Tabela 4: Peptídeos sequenciados com suas características bioquímicas determinadas pelo programa de bioinformática Expasy.

<b>Peptídeo</b>	<b>Nº aminoácidos</b>	<b>Massa molecular</b>	<b>pI</b>	<b>Polaridade</b>
<b>GLSDGEWQQVLNVWGK</b>	16	1816.0	4.37	Anfipático
<b>TGHPETLEK</b>	9	1011.1	5.37	Hidrofílico
<b>ALELFR</b>	6	747.8	6.05	Hidrofóbico

A polaridade destes peptídeos, foram analisados, utilizando o programa Hidropathicity Plots, disponibilizado pelo site <http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>, como mostram as figuras 25, 26 e 27, também foi analisado a possibilidade destas clivagens ocorrerem nestes locais, como mostrado na figura 27. Essas análises foram feitas utilizando o programa PeptideCutter, disponibilizado no site <http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/>.

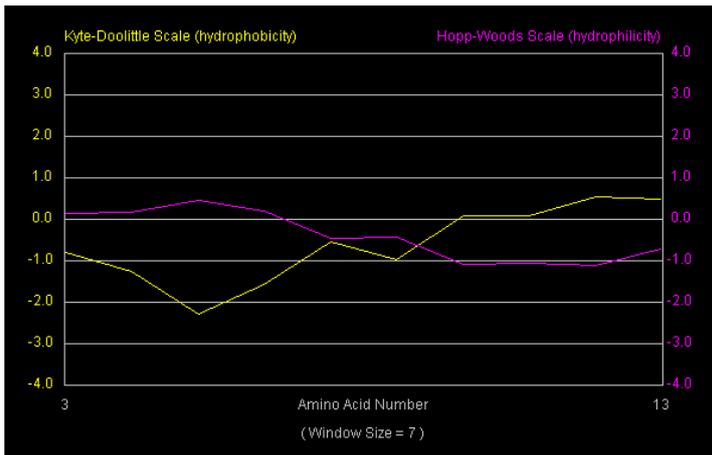


Figura 25: Análise da polaridade do peptídeo GLSDGEWQQVLNVWGK (27), utilizando a escala de Kyte-Doolittle (traço amarelo) que representa a hidrofobicidade e Hoop-Woods (traço roxo) que representa a hidrofiliicidade.

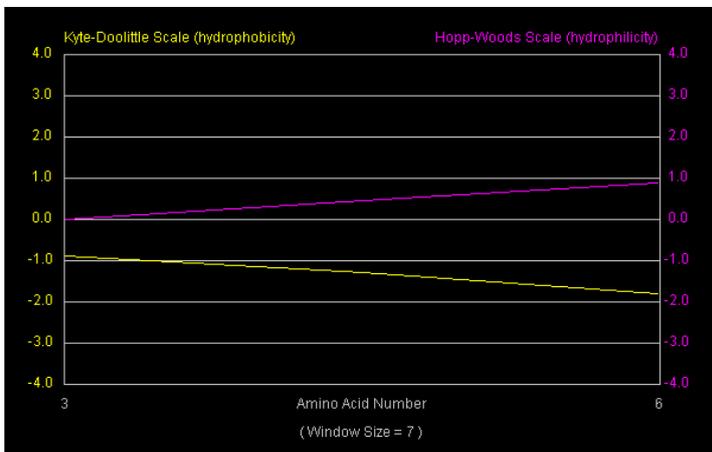


Figura 26: Análise da polaridade do peptídeo TGHPETLEK (24), utilizando a escala de Kyte-Doolittle (traço amarelo) que representa a hidrofobicidade e Hoop-Woods (traço roxo) que representa a hidrofiliicidade.

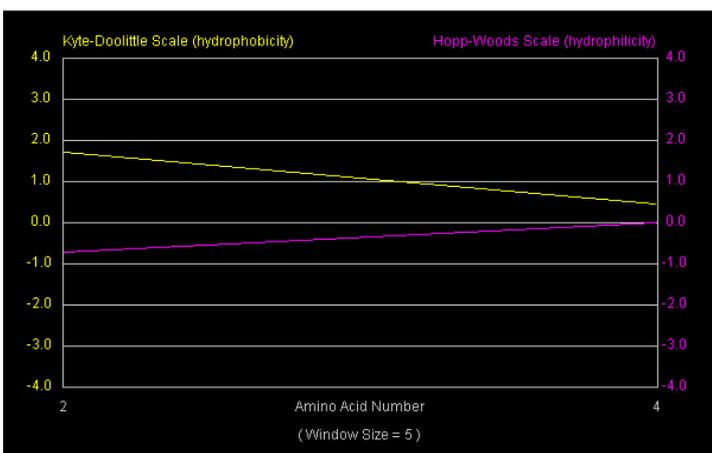


Figura 27: Análise da polaridade do peptídeo ALELFR (28), utilizando a escala de Kyte-Doolittle (traço amarelo) representando a hidrofobicidade e Hoop-Woods (traço roxo) representando a hidrofiliicidade.

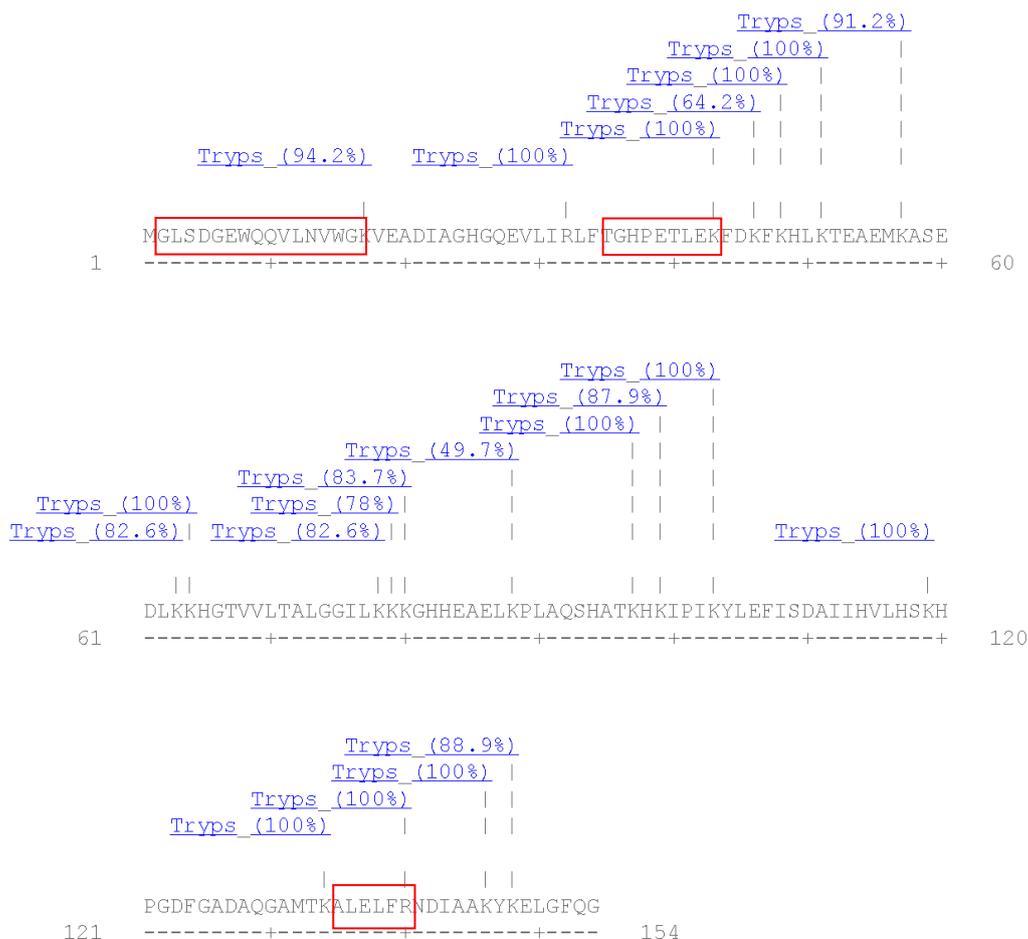


Figura 28: Análise das possíveis clivagens, indicadas em azul (porcentagem), que podem ocorrer na hidrólise da mioglobina utilizando como enzima a tripsina, utilizando o programa de bioinformática PeptideCutter, marcado com o retângulo vermelho estão os peptídeos que foram sequenciados.

Determinada as sequências dos peptídeos, foi realizado a localização desses peptídeos na proteína íntegra para observar se estes peptídeos estavam na parte externa ou interna da proteína íntegra. Utilizando o programa Cn3D 4.1, disponibilizado pelo site NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>, foi observado que os peptídeos gerados se localizavam na parte externa da proteína, assim sendo de fato um alvo mais evidente para as proteases. Essa localização pode ser vista na figura 29 (A e B).

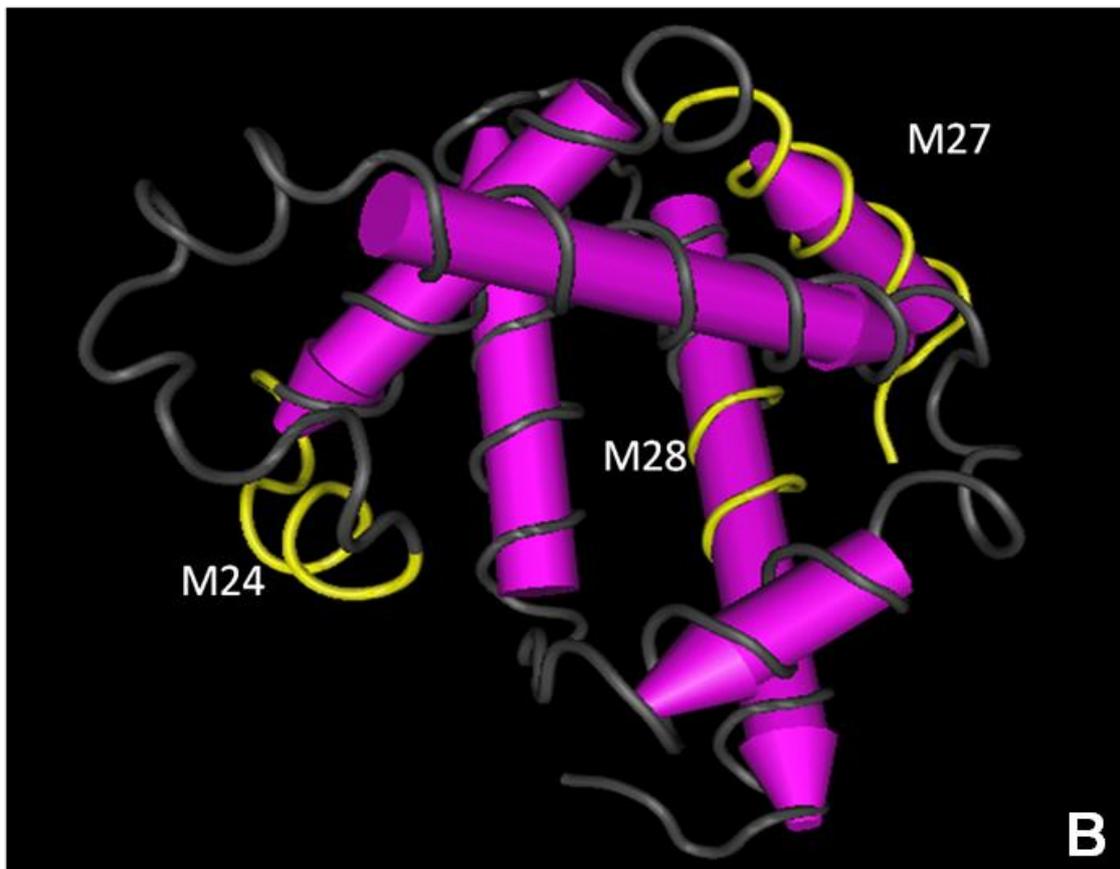
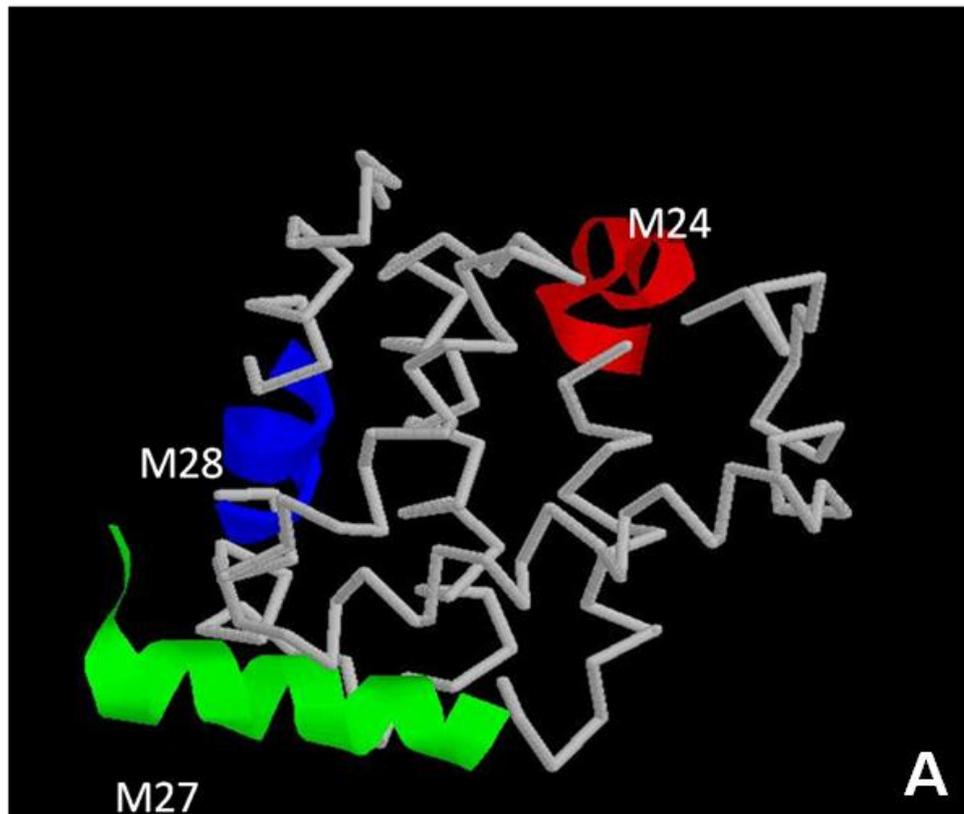


Figura 29: A e B - Localização dos peptídeos, obtidos através da hidrólise da mioglobina com T, na proteína íntegra da mioglobina, utilizando um programa de modelagem, Cn3D.

#### **4.5.5 Síntese de peptídeos**

O peptídeo referente ao pico 28, ALELFR, foi submetido a síntese de peptídeo, pois o rendimento era mais baixo do que o esperado e assim seria preciso muito tempo para conseguir a quantidade necessária deste peptídeo.

A síntese deste peptídeo foi realizada pela estratégia de Fmoc, onde foi obtido o peptídeo sintético do peptídeo de referência ALELFR e este foi analisado por CLAE e visto que o sintético estava puro.

#### **4.5.6 Teste de viabilidade celular (Fn1) com os picos purificados da hidrólise da mioglobina com tripsina**

Depois de identificado as frações ativas, sendo a fração VIII da hidrólise da mioglobina, essa fração foi purificada utilizando CLAE, e os picos coletados foram testados novamente na mesma linhagem celular, Fn1, para avaliar qual pico contido na fração VIII teve atividade proliferativa.

Neste experimento foram testados apenas os picos 24, 27 e 28, sendo que os peptídeos 24 e 27 apresentaram melhor rendimento na purificação e o peptídeo 28 foi sintetizado, pois seu rendimento era abaixo do esperado.

A atividade proliferativa dos picos 24, 27 e 28 desta fração, foi analisada pelo teste ANOVA com valor de significância de  $P < 0,05$ . Esses picos induziram proliferação celular, sendo que para os picos 24 e 27 tiveram essa indução diminuída de acordo com a diminuição da concentração aplicada do peptídeo (figura 30 e 31 respectivamente). Utilizando o peptídeo 28 observou-se uma proliferação, mas diferentemente da indução de proliferação dos outros peptídeos, nas concentrações intermediárias houve uma indução de proliferação maior, como pode ser visto na figura 32.

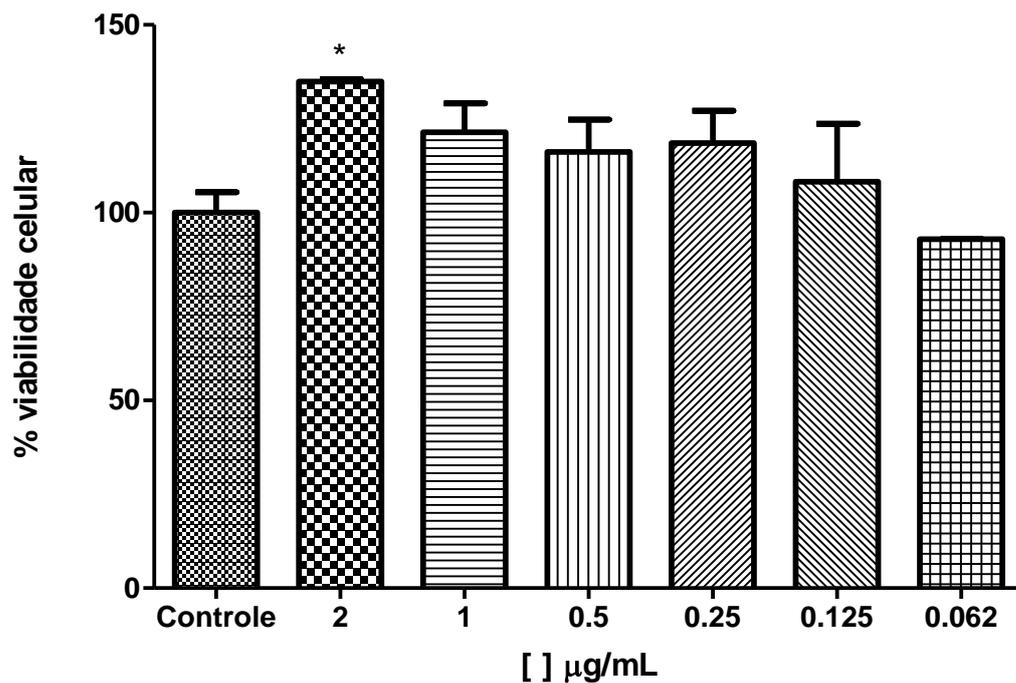


Figura 30: Teste de MTT, utilizando o peptídeo 24 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

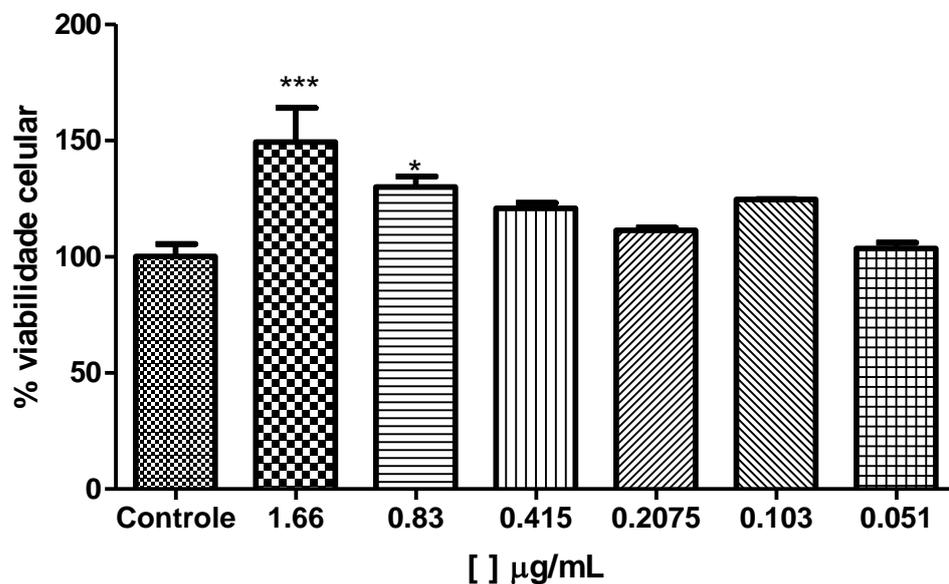


Figura 31: Teste de MTT, utilizando o peptídeo 27 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

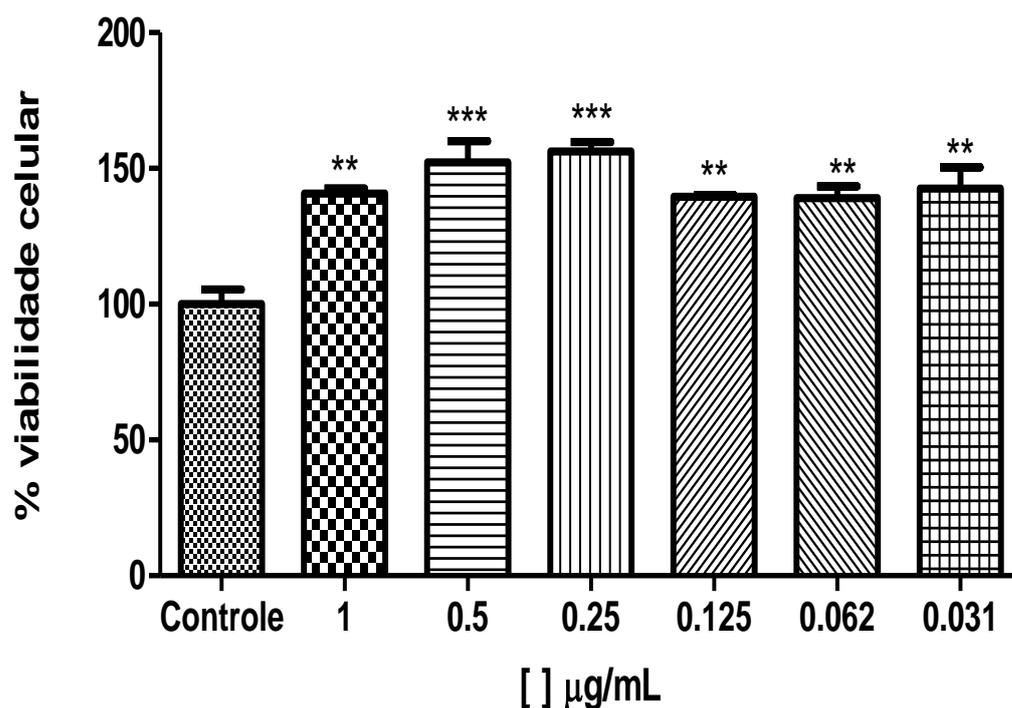


Figura 32: Teste de MTT, utilizando o peptídeo 28 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

Depois de testados os picos referentes à fração VIII, foi também testado o peptídeo sintético para observar a atividade, podendo ser comparado com o peptídeo natural, obtido pela purificação do hidrolisado de mioglobina. Com este teste foi possível observar que o sintético induziu a proliferação celular tal como o peptídeo natural (figura 33).

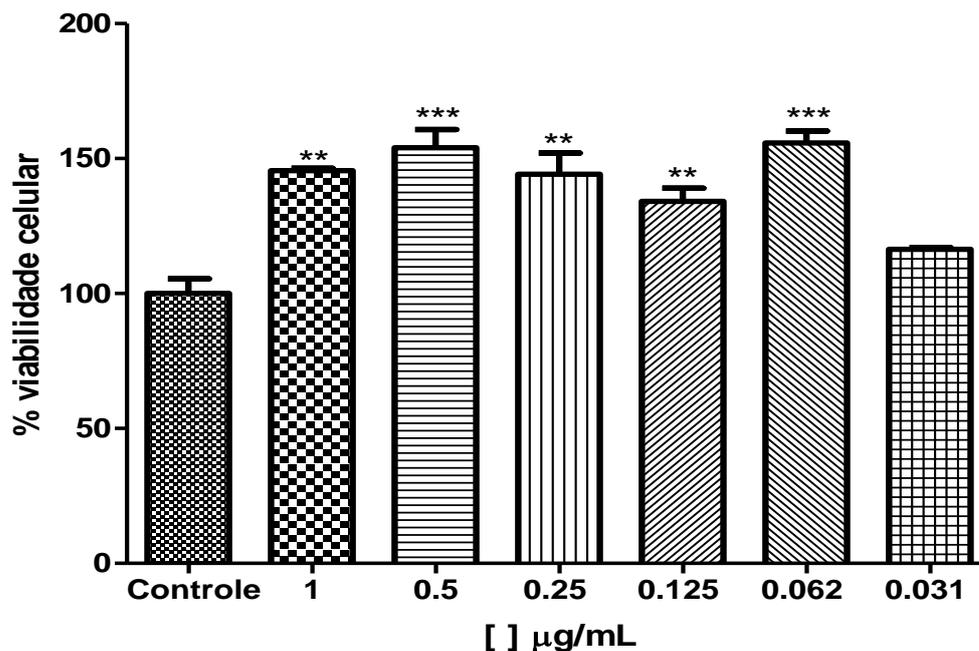


Figura 33: Teste de MTT, utilizando o peptídeo sintético, referente ao peptídeo 28, em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn1. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

#### 4.5.7 Quantificação da produção de colágeno por espectrofotometria com picrosirius red

Depois de realizado o MTT, foi feito também o ensaio de Picrosirius red, para quantificar o colágeno produzido pela interação da amostra aplicada com a cultura celular, pois sabe-se que a linhagem Fn1 tem como sua função produzir colágeno e com este ensaio foi possível observar que quando incubado as células com os peptídeos, obtidos da mioglobina, a produção de colágeno não foi igual a produção de colágeno das células controle, que foram incubadas somente com meio de cultura, esse resultado se observa para todos os peptídeos aplicados nas células com exceção do peptídeo 28 e sintético que a diminuição não foi tão significativa já que se pode observar que em concentrações intermediárias ficou muito semelhante ao controle (figura 34, 35, 36 e 37 respectivamente).

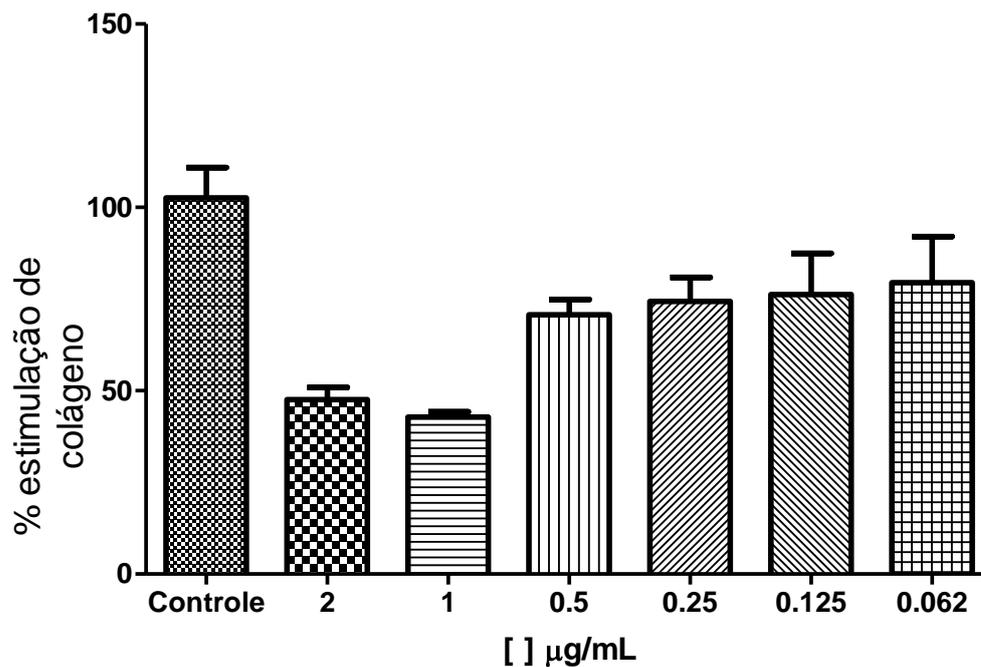


Figura 34: Gráfico obtido pelo resultado do teste de Picrosirius red, para quantificar a porcentagem de estimulação da produção de colágeno, utilizando o peptídeo 24 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1.

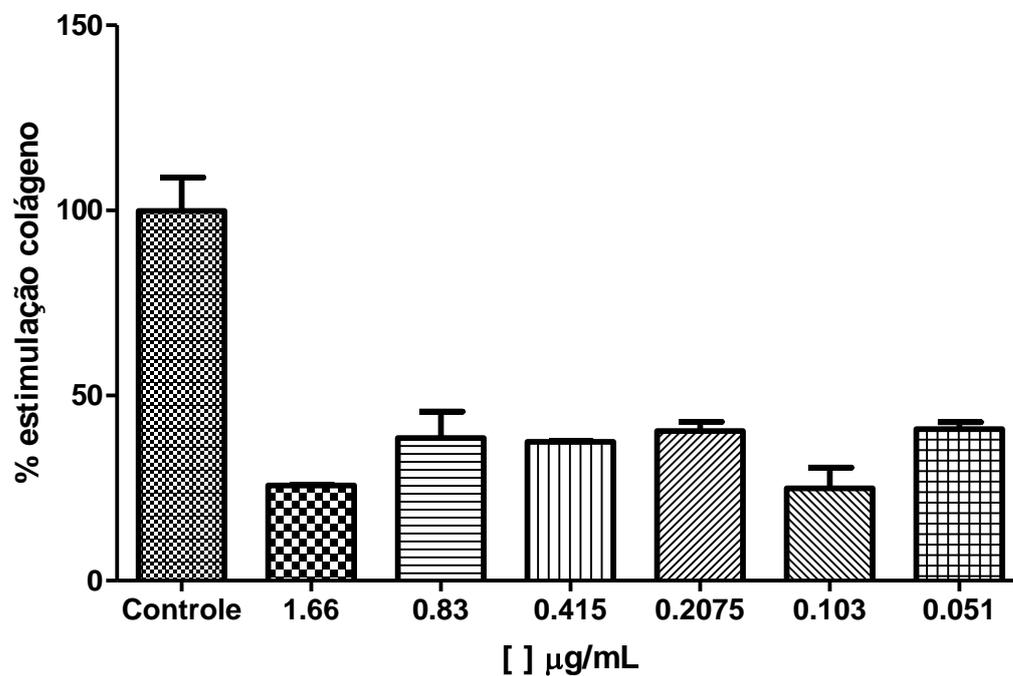


Figura 35: Gráfico obtido pelo resultado do teste de Picrosirius red, para quantificar a porcentagem de estimulação da produção de colágeno, utilizando o peptídeo 27 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1.

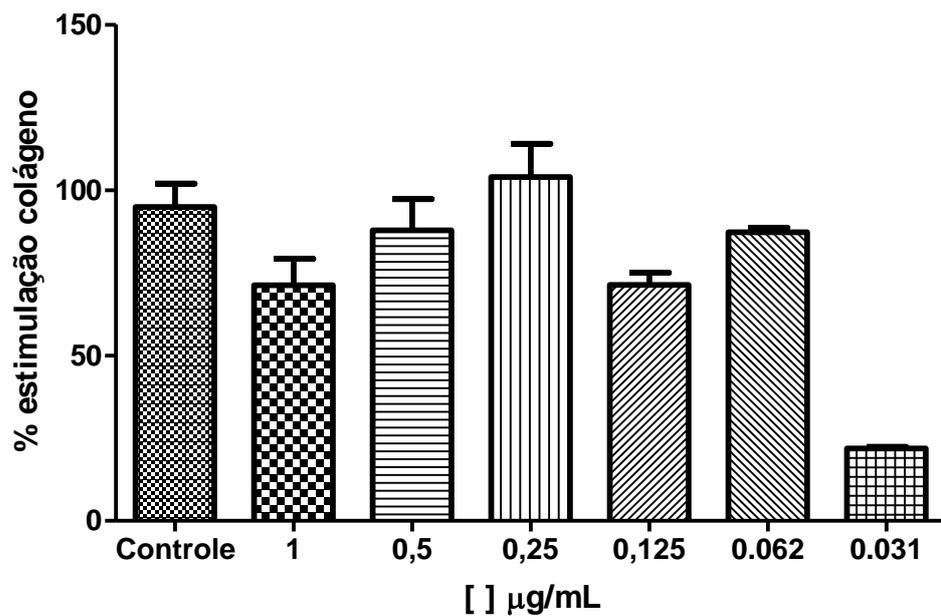


Figura 36: Gráfico obtido pelo resultado do teste de Picosirius red, para quantificar a porcentagem de estimulação da produção de colágeno, utilizando o peptídeo 28 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1.

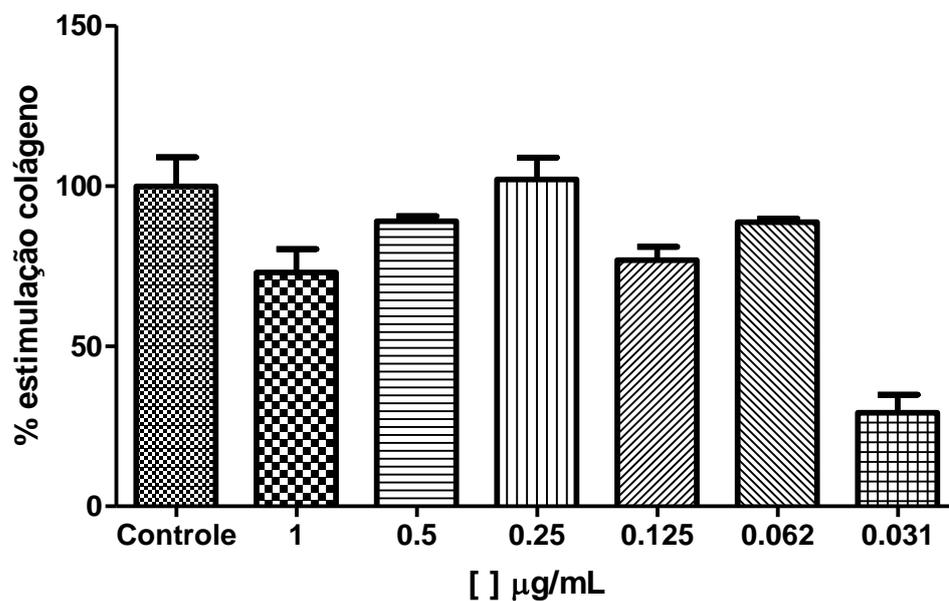


Figura 37: Gráfico obtido pelo resultado do teste de Picosirius red, para quantificar a porcentagem de estimulação da produção de colágeno, utilizando o peptídeo sintético em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1.

#### 4.5.8 Teste viabilidade celular em HUVEC's com peptídeos da mioglobina

As sequências dos peptídeos obtidos da mioglobina após a hidrólise com tripsina, foram testados também em linhagem celular, HUVEC's, para observar se também induziam atividade proliferativa. Neste ensaio foi visto que todos os peptídeos utilizados induziram a proliferação celular desta linhagem, em diferentes concentrações, como pode ser visto nas figuras 38, 39 e 40.

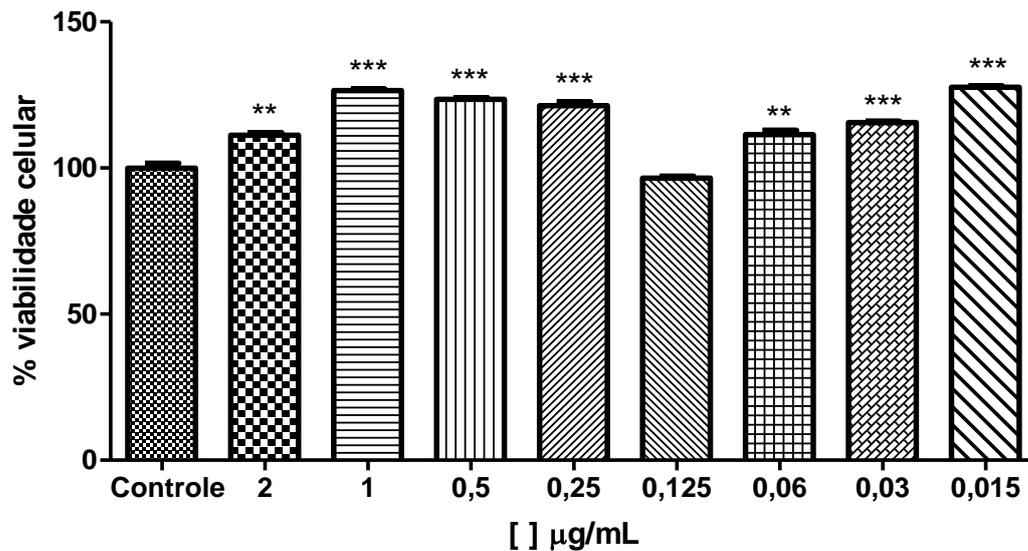


Figura 38: Teste de MTT, utilizando o peptídeo 24 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo HUVEC's. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

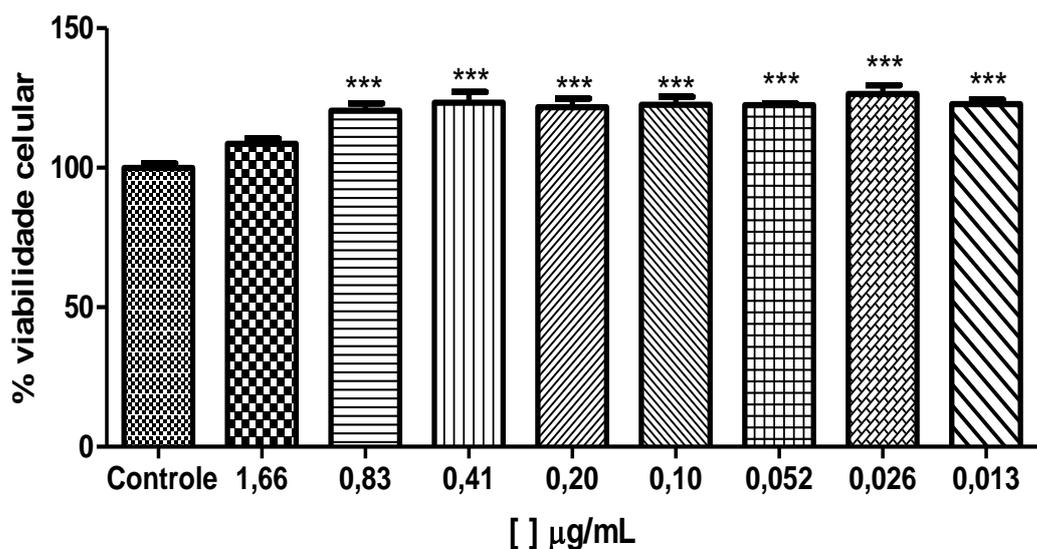


Figura 39: Teste de MTT, utilizando o peptídeo 27 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo HUVEC's. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

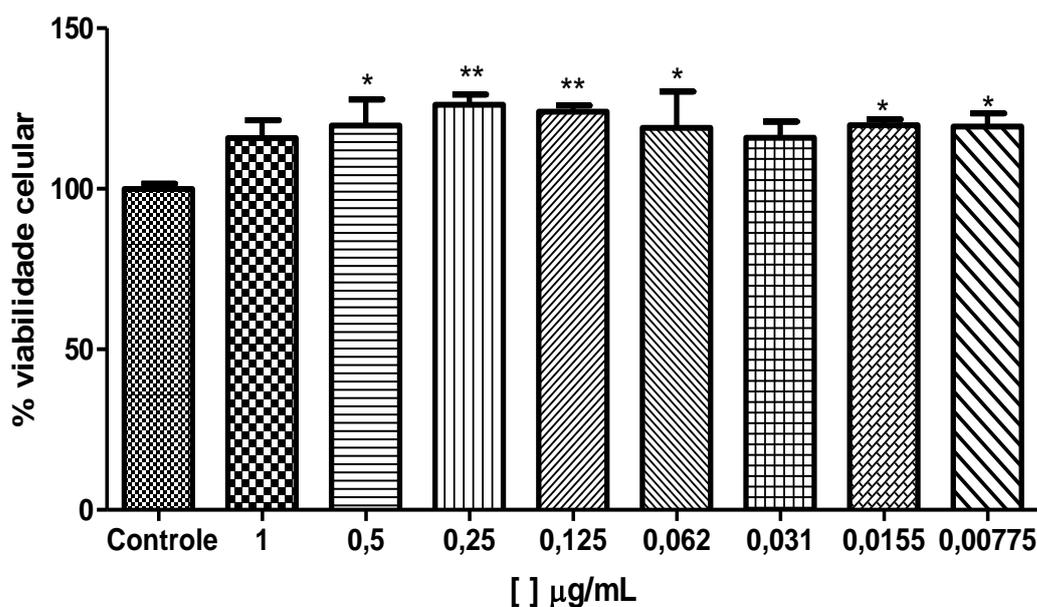


Figura 40: Teste de MTT, utilizando o peptídeo sintético em diferentes concentrações em cultura de células do tipo HUVEC's. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

Com este teste de MTT, para avaliação da atividade proliferativa dos peptídeos obtidos pela hidrólise da mioglobina com T, foi possível observar que os peptídeos apresentaram atividade proliferativa, que foi determinada como significativa utilizando o teste ANOVA com  $P < 0,05$ , sendo que entre esses peptídeos, o mais ativo foi a concentração de 0,00775 do peptídeo sintético, ALELFR.

## 4.6 Isolamento e caracterização dos compostos obtidos através da hidrólise da hemoglobina com tripsina

### 4.6.1 Isolamento das frações obtidas do hidrolisado de hemoglobina com tripsina

Com o objetivo de produzir outros peptídeos, realizamos os experimentos empregando a hemoglobina como substrato e utilizando a mesma metodologia empregada para a mioglobina. Após a incubação por 18 horas foi feito o procedimento de precipitação. As amostras foram fracionadas utilizando CLAE. Essas frações foram, primeiro, separadas por frações e essas frações foram coletados para observar sua atividade em cultura celular. As frações foram coletados como mostra a figura 41.

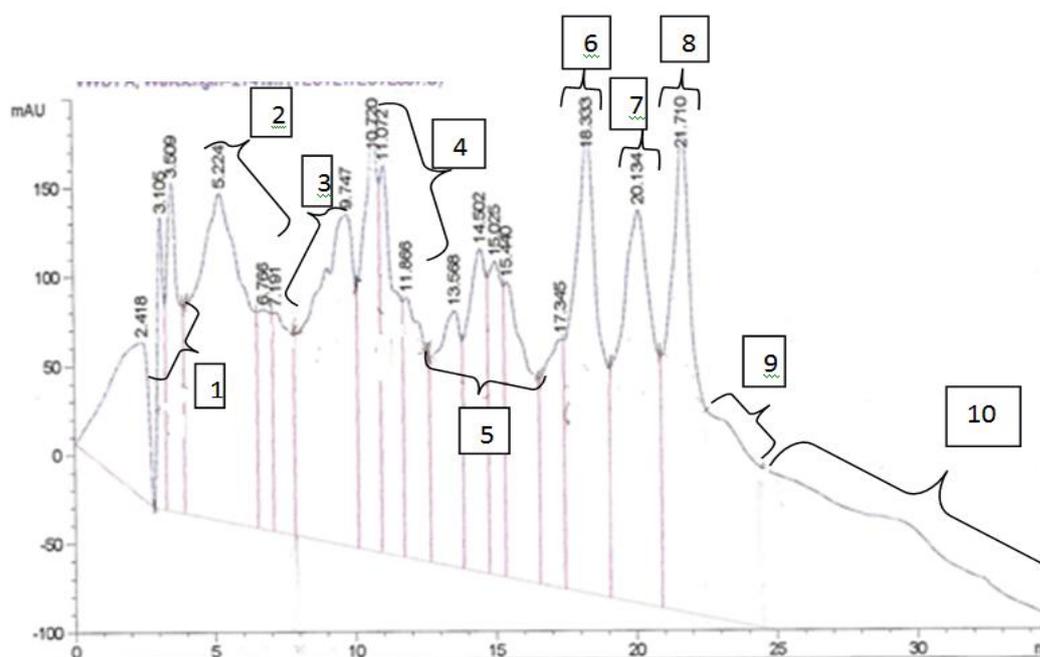


Figura 41: Cromatograma do hidrolisado de hemoglobina com T, por 18 horas. Análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% de ACN com 10% de solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa.

#### 4.6.2 Teste de viabilidade celular (FN1) com as frações da hidrólise de hemoglobina com tripsina

A viabilidade celular foi testada nas linhagens Fn1, que foram tratadas, primeiro com as frações coletadas por CLAE. Essa atividade foi analisada pela metodologia do MTT, onde foi determinada a atividade proliferativa destas frações nas culturas de células. Com este ensaio, foi possível observar que as frações coletadas do hidrolisado de hemoglobina com T induziram proliferação celular discreta. A melhor indução de proliferação foi obtida com as duas primeiras frações (figura 42).

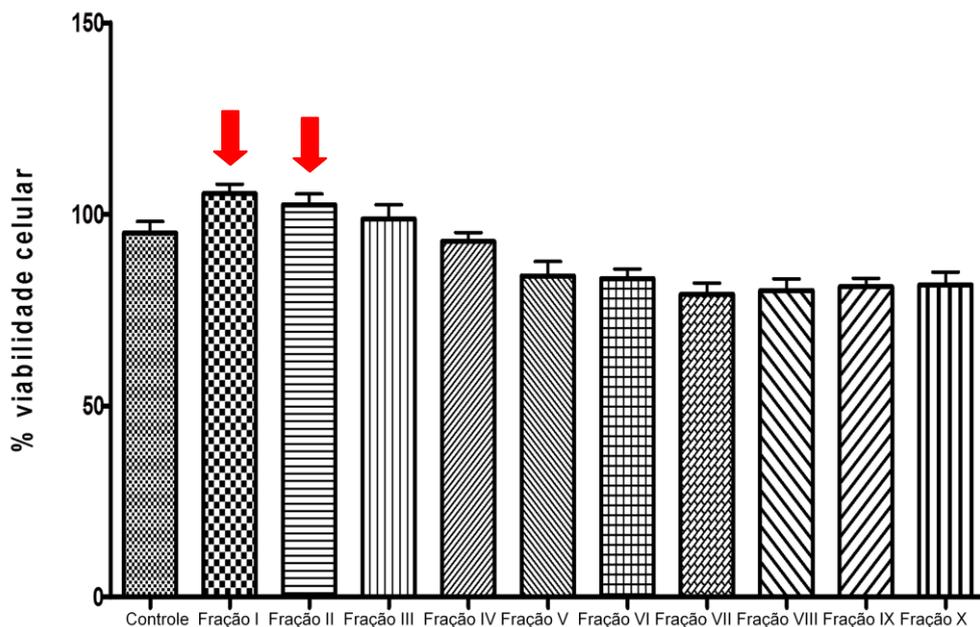


Figura 42: Teste de MTT com as frações do hidrolisado da hemoglobina com T em cultura de células do tipo Fn1. As setas indicam as frações que induziram melhor uma proliferação, mesmo sendo discreta.

Estas frações foram testadas novamente em cultura de células, utilizando a mesma metodologia, foi determinada a utilização da fração I do hidrolisado da hemoglobina com T, pois a indução de proliferação permaneceu, em outros ensaios, maior.

### 4.6.3 Purificação dos peptídeos

Com a fração escolhida, fração I, esta foi purificada utilizando CLAE, e os picos foram coletados e testados em células, utilizando a mesma metodologia já descrita do teste de viabilidade celular utilizando o MTT.

Os picos referentes à fração I, da hidrólise da hemoglobina com T, foram coletados como mostra a figura 43, e depois esses picos foram testados.

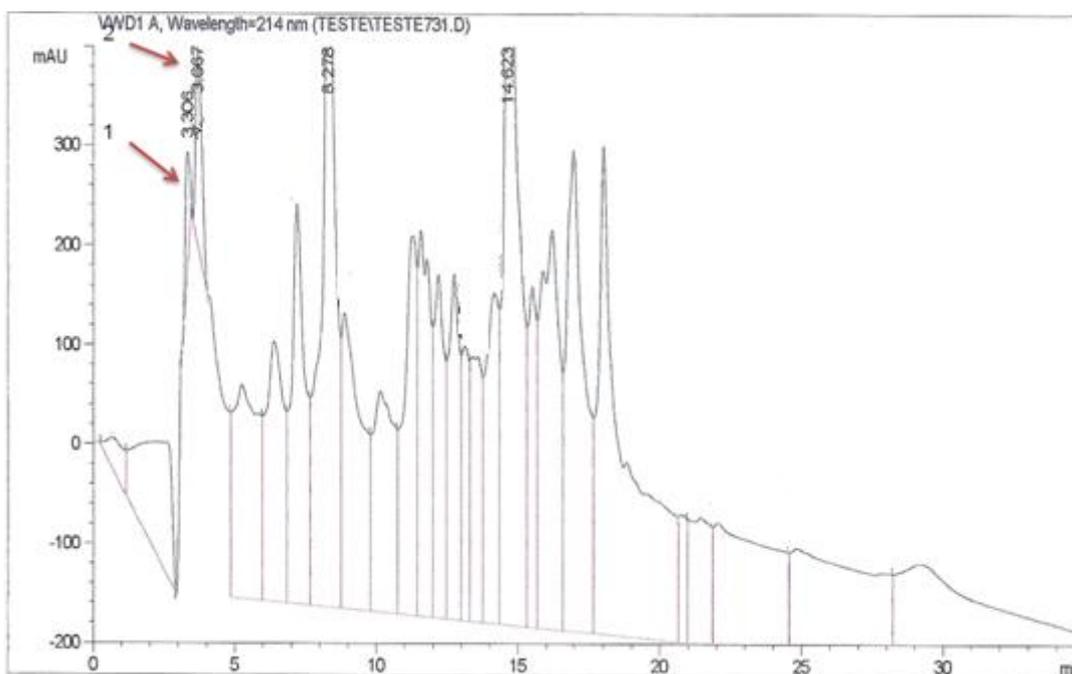


Figura 43: Cromatograma do hidrolisado de hemoglobina com T, por 18 horas. Análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% de ACN com 10% solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa. As setas indicam os picos que foram coletados.

### 4.6.4 Teste de viabilidade celular (Fn1) com picos da hidrólise de hemoglobina com tripsina

Depois de identificada a fração ativa, fração I da hidrólise da hemoglobina com T, essa fração foi repurificada e os picos coletados. Esses picos foram testados, utilizando o teste de MTT na mesma linhagem celular, Fn1. Dos picos testados, o pico 1 apresentou maior indução de proliferação celular.

O pico 1, proveniente da fração I da hidrólise da hemoglobina com T, foi testado em diferentes concentrações. É possível observar na figura 44 que o pico 1 induziu proliferação celular nas diferentes concentrações, sendo que em concentrações menores teve maior indução de proliferação. Essa indução da atividade proliferativa foi avaliada utilizando o método ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

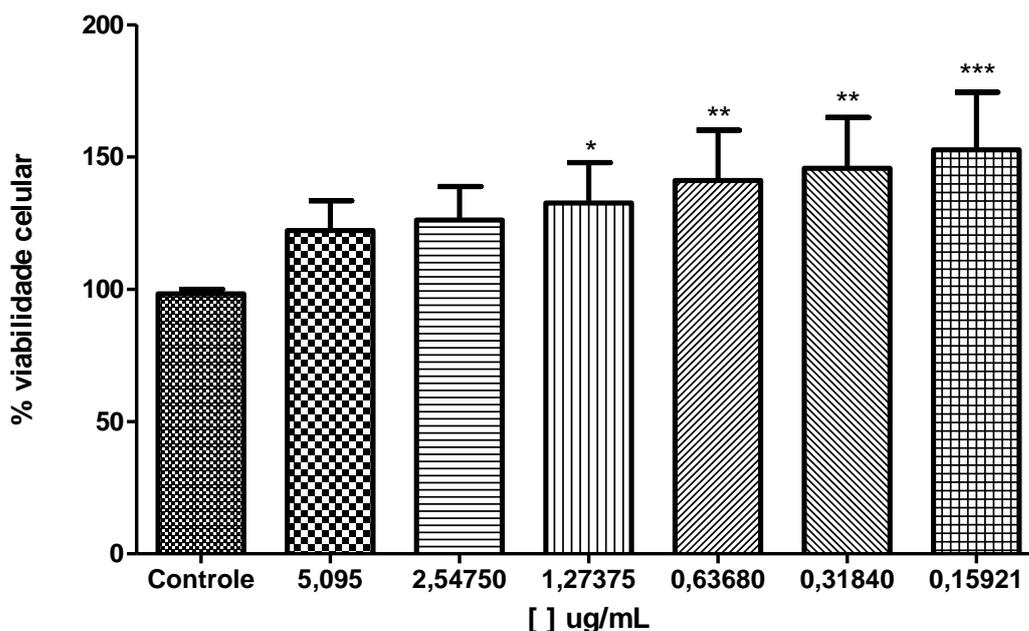


Figura 44: Teste de MTT com o pico 1, proveniente da fração I, em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn1. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

#### 4.6.5 Picrosirius red

Após feito o teste de MTT para avaliar a atividade proliferativa do pico 1, foi realizado o ensaio de picrosirius red, para quantificar o colágeno produzido pela interação do peptídeo, pico 1, com a cultura de células do tipo Fn1. Os resultados deste experimento foram expressos em porcentagem, de acordo com o controle, sendo que neste teste utilizando o pico 1 proveniente da fração I da hidrólise de hemoglobina com T. Foi observado que este pico apresenta estimulação da produção de colágeno nas culturas de células do tipo Fn1, como é mostrado na figura 45.

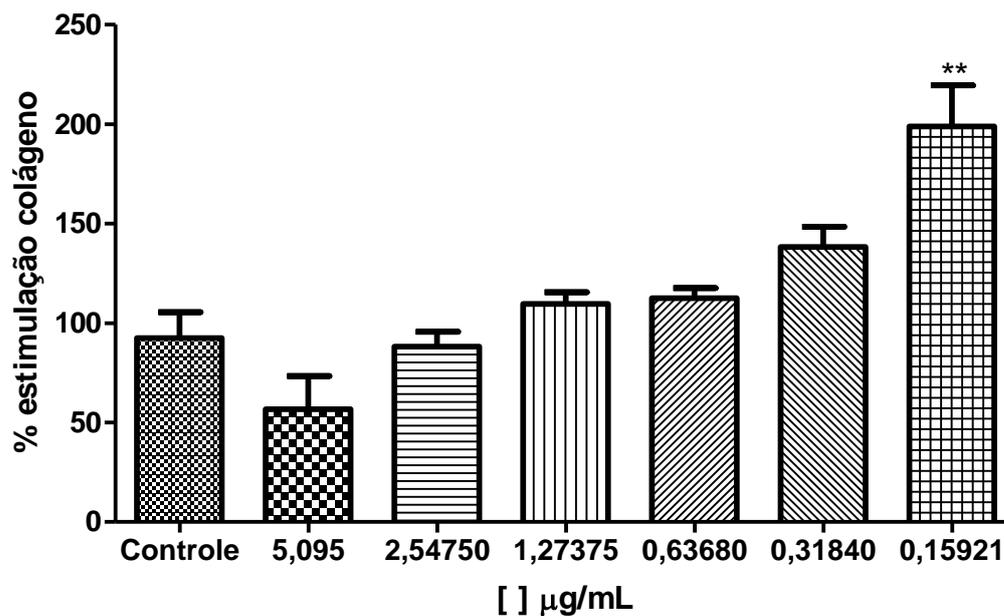


Figura 45: Gráfico obtido pelo resultado do teste de picosirius red, para quantificar a porcentagem de estimulação da produção de colágeno utilizando o pico 1, proveniente da fração I da hidrólise da hemoglobina com T, em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn1.

#### 4.6.6 Análise de peptídeos gerados pela hidrólise de hemoglobina com tripsina

Foi realizado a análise das possibilidades de ocorrerem as clivagens na proteína da hemoglobina, utilizando um programa de bioinformática, PeptideCutter, disponibilizado pelo site [HTTP://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/](http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/). Essa análise pode ser visualizada na figura 46.



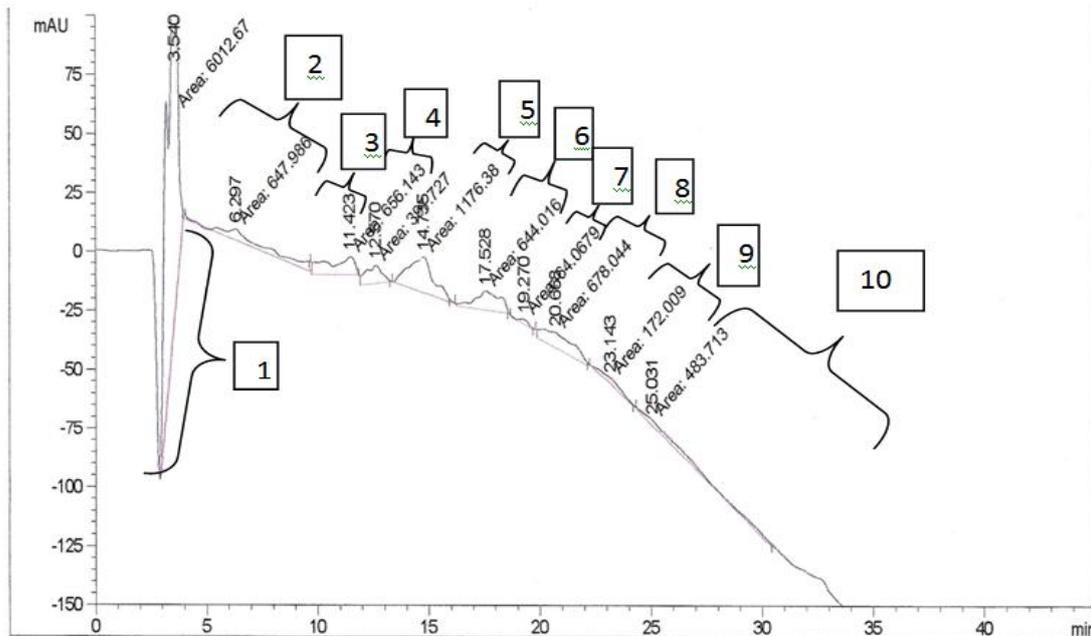


Figura 47: Cromatograma do hidrolisado de colágeno com T, por 18 horas, utilizando CLAE, com uma análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B, monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C<sub>18</sub> fase reversa. Este cromatograma mostra a coleta das frações (quadrados pretos) da hidrólise de colágeno com T.

#### 4.7.2 Teste viabilidade celular com frações da hidrolise de colágeno com tripsina

A viabilidade celular foi testada nas linhagens Fn1, que foram tratadas, primeiro com as frações coletadas por CLAE, para assim observar a atividade destas frações. Essa atividade foi observada pela metodologia do MTT, onde foi determinada a atividade proliferativa induzida pelas frações nas culturas de células. Neste ensaio foi possível observar que as frações testadas induziram proliferação celular, sendo que as frações VIII, IX e X apresentaram maior indução de proliferação celular, como pode ser visto na figura 48.

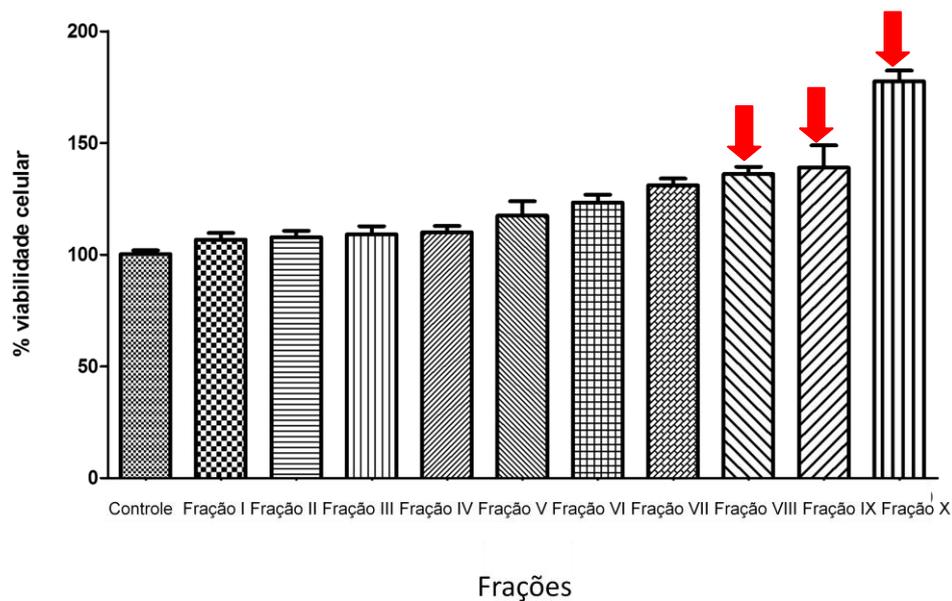


Figura 48: Teste de MTT utilizando as frações do hidrolisado do colágeno com T, onde é mostrado com setas as frações que tiveram maior atividade proliferativa em cultura de células do tipo Fn1, e que foram testados novamente e depois purificados.

#### 4.7.3 Purificação dos peptídeos

Cada fração coletada foi testada e observada sua atividade proliferativa. Essas frações que induziram atividade proliferativa em células foram novamente testadas em cultura de células. No segundo teste celular foi confirmada as atividades proliferativas das frações, portanto foi determinado que as frações IX e X fossem repurificadas, como pode ser visto na figura 49.

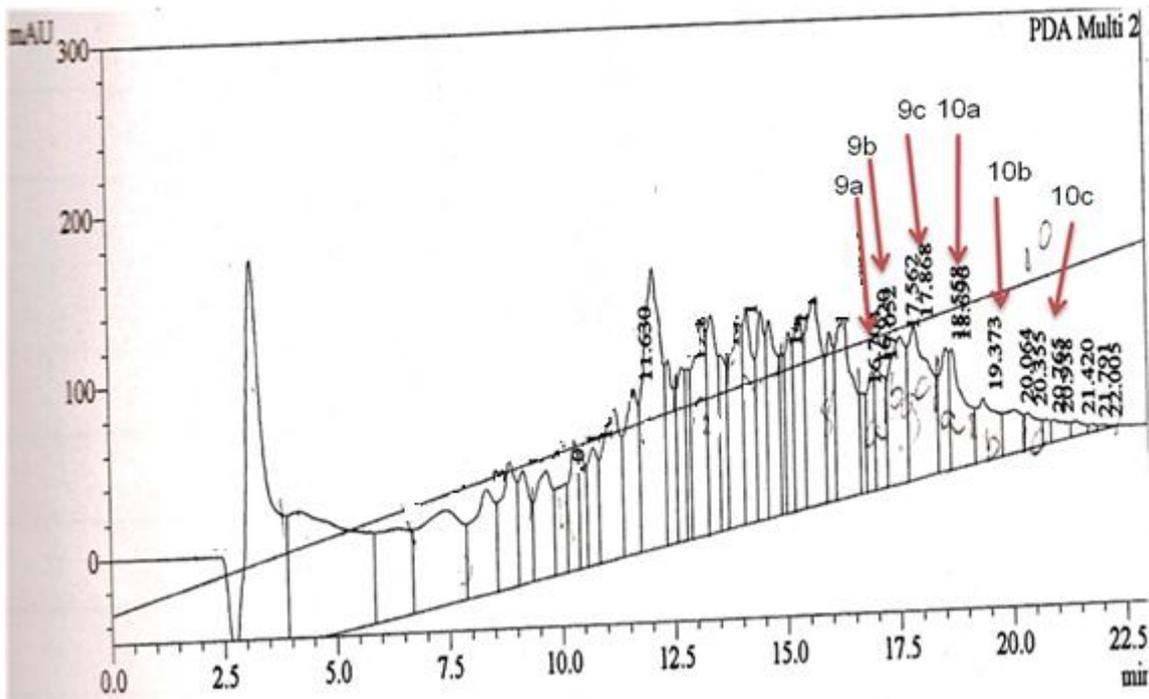


Figura 49: Cromatograma do hidrolisado de colágeno com T, por 18 horas. Análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% ACN com 10% solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa. Este cromatograma mostra a coleta dos picos (setas), referentes a fração IX e X da hidrólise de colágeno com T.

Como pode ser visto o colágeno não obteve um rendimento muito bom de peptídeos, inviabilizando a realização do teste de viabilidade celular após a incubação com os picos purificados.

#### 4.8 Isolamento e caracterização dos compostos obtidos através da hidrólise da porção Fc da cadeia pesada da IgG com tripsina

##### 4.8.1 Isolamento das frações obtidas dos hidrolisados da porção Fc da cadeia pesada da IgG com tripsina

Seguindo a mesma metodologia empregada para os outros substratos, foi feito o mesmo com a porção Fc da cadeia pesada da IgG. Após incubação por 18 horas e precipitação, a amostra foi fracionada utilizando CLAE (figura 50).

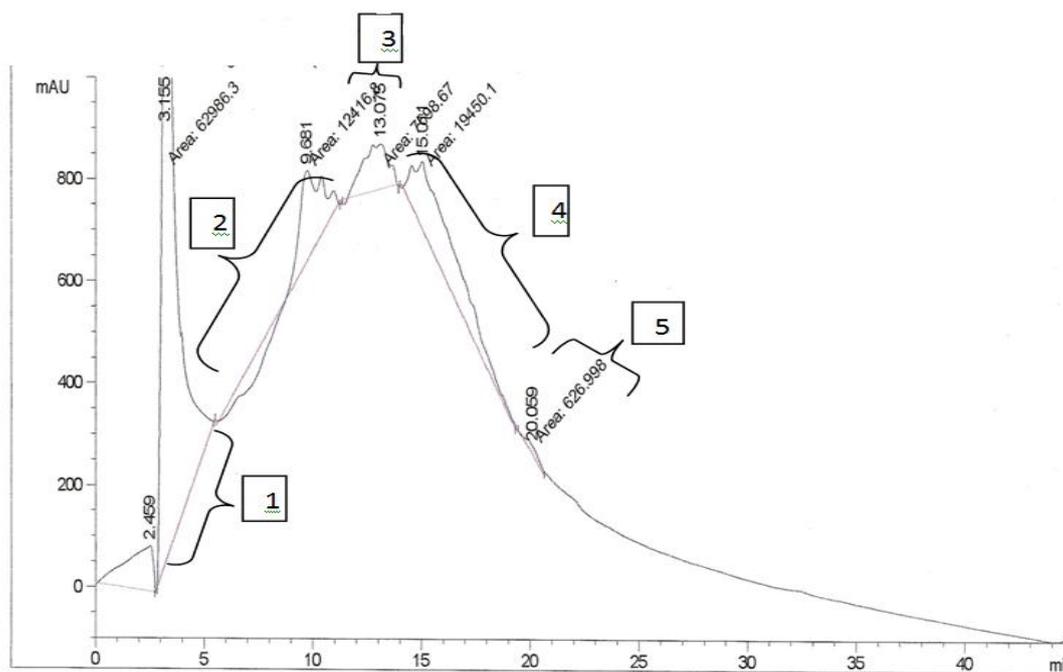


Figura 50: Cromatograma do hidrolisado da porção Fc da cadeia pesada da IgG com T, por 18 horas. Análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% ACN com 10% de solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa. Este cromatograma mostra a coleta das frações (quadrados pretos).

#### 4.8.2 Teste viabilidade celular com frações da hidrólise de Fc IgG com tripsina

A viabilidade celular foi testada nas linhagens Fn1, que foram tratadas, primeiro com as frações coletadas por CLAE, para assim observar a atividade destas frações. Essa atividade foi observada pela metodologia do MTT, onde foi determinada a atividade proliferativa destas frações nas culturas de células, como pode ser visto na figura 51.

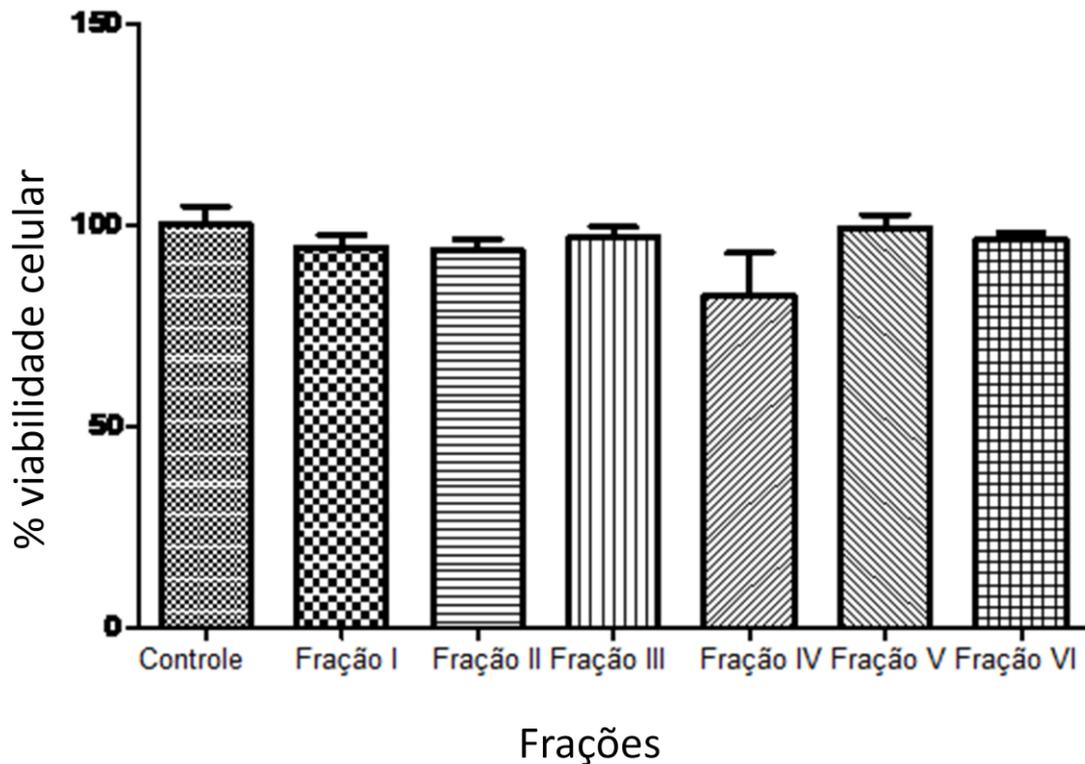


Figura 51: Teste de MTT utilizando as frações coletadas do hidrolisado da porção Fc da cadeia pesada da IgG com T, em cultura de células do tipo Fn1, onde pode ser visto que não houve uma atividade significativa de nenhuma das frações.

Como pode ser observado na figura 51 as frações coletadas do hidrolisado da Fc IgG com T, não apresentaram atividade proliferativa significativa. Por outro lado a fração IV apresentou citotoxicidade, sendo assim a fração IV foi submetida novamente a purificação, com a tentativa de isolar algum peptídeo.

#### 4.8.3 Purificação dos peptídeos

Essas frações foram purificadas novamente utilizando CLAE, e estes picos coletados foram também testados em cultura de células do tipo Fn1, pelo teste de MTT, para avaliar novamente sua atividade proliferativa ou citotóxica. A coleta desses picos foi realizada como mostra a figura 52.

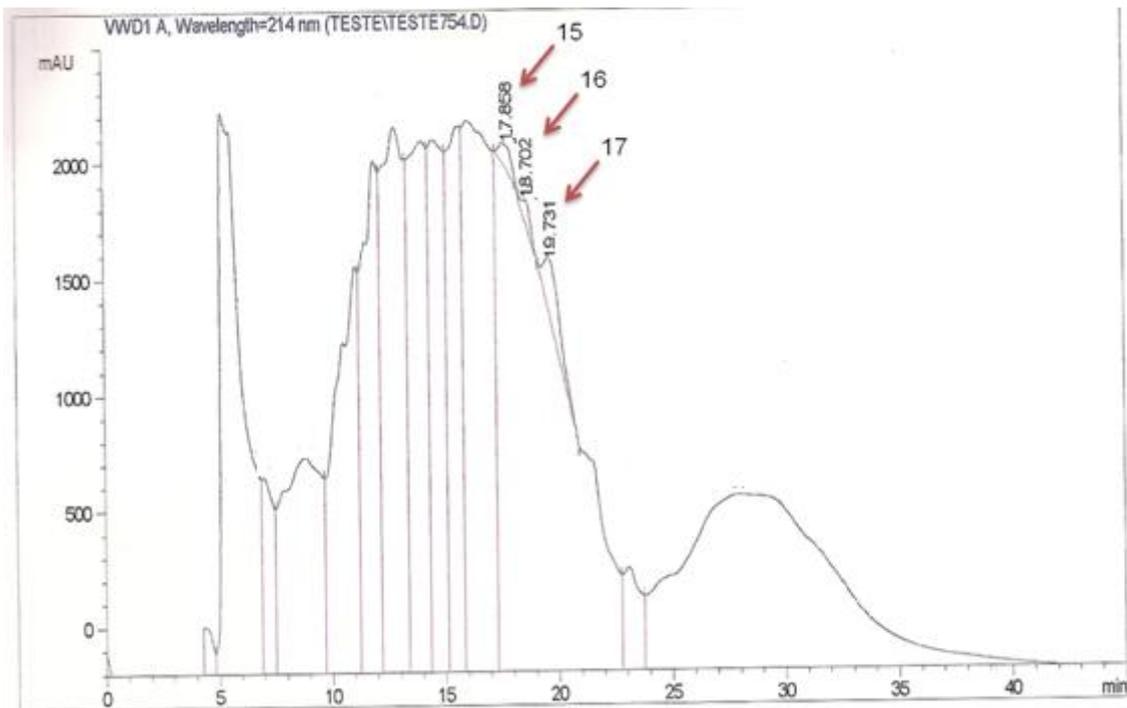


Figura 52: Cromatograma do hidrolisado da porção Fc da cadeia pesada da IgG com T, por 18 horas. Análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% ACN com 10% de solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa. Este cromatograma mostra a coleta dos picos (setas) referentes a fração IV da hidrólise da porção Fc da cadeia pesada da IgG com T.

Como pode ser visto na figura 52, a hidrólise da porção Fc da cadeia pesada da IgG não apresentou um cromatograma satisfatório, pois os picos presentes neste cromatograma não se apresentaram muito bem separados, sendo assim esses picos coletados não foram testados em cultura de células do tipo Fn1.

## 5. Determinar o melhor tempo de hidrólise dos substratos utilizando pSPBJ

Com relação ao controle de hidrólise com T e visto que este tempo foi estabelecido com 18 horas, foi então feito a hidrólise com pSPBJ, isolada do veneno total de *Bothrops jararaca*. Para isso foi preciso determinar o tempo de hidrólise utilizando a pSPBJ, realizando uma cinética até o tempo total de 36 horas. Durante o período da cinética foram coletadas alíquotas da seguinte forma: 0 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12

horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 26 horas, 28 horas, 30 horas, 32 horas, 34 horas e 36 horas. Após a cinética essas alíquotas foram analisadas por CLAE.

Nesta etapa foi utilizado como substrato a mioglobina, pois foi o substrato que apresentou melhor hidrólise utilizando T e também o substrato que gerou peptídeos que foram seqüenciados.

Estabelecido então o substrato para incubar com pSPBJ, foi determinado o melhor tempo de hidrólise utilizando análise dos cromatogramas obtidos e definido como sendo 36 horas.

### **5.1 Precipitação do hidrolisado com pSPBJ**

Determinado o tempo de hidrólise, (36 horas), foi então empregada a mesma metodologia utilizada com a hidrólise da mioglobina pela T, obedecendo o protocolo de v:v de ácido acético 0,1 N e quantidade de hidrolisado.

### **5.2 Purificação dos peptídeos gerados a partir da hidrólise de mioglobina com pSPBJ**

O hidrolisado precipitado foi analisado por CLAE, onde foi comparado com o perfil do hidrolisado de mioglobina com T, como mostram as figuras 53 (A, B, C e D) onde o traço azul é hidrolise da mioglobina com T e a vermelha é a hidrólise com pSPBJ.



No conjunto da figura 53, é possível observar que os picos 24, 27 e 28 referentes à hidrólise da mioglobina com T, são semelhantes aos picos da hidrólise da mioglobina com pSPBJ, tendo o tempo de retenção muito semelhante.

No geral, os perfis apresentaram um tempo de retenção semelhante, mas com relação aos picos encontrados na hidrólise utilizando a pSPBJ, foi determinado que esses picos seriam analisados através de sequenciamento de aminoácidos. Por outro lado, como a concentração destes picos apresentavam-se abaixo do necessário pelo aparelho de sequenciamento, foi preciso mudar a estratégia e posteriormente esses criptídeos serão sequenciados através de análise por espectrômetro de massas. Assim será possível avaliar a homologia existente entre os criptídeos gerados por T e os criptídeos gerados por pSPBJ.

## 6. Discussão

Os acidentes ofídicos passaram a ser de notificação obrigatória no país em 1987, estabelecendo-se, entre o Ministério da Saúde e as Secretarias Estaduais de Saúde, um sistema de troca de soros por informações epidemiológicas (Cardoso et al., 2003). A implantação desse sistema, incorporando elementos do sistema de vigilância epidemiológica já existente em São Paulo, permitiu um melhor dimensionamento do ofidismo (Cardoso et al., 2003).

O Brasil possui uma riquíssima fauna de serpentes e, apesar de contar com tradicionais instituições e especialistas no assunto, muitas espécies dessa fauna são ainda mal conhecidas ou pouco estudadas, embora essa situação venha se modificando nos últimos anos. O gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, já que produzem a maioria dos acidentes ofídicos no Brasil (Melgarejo, 2003). Quando ocorre um acidente botrópico, na maioria dos casos há uma inoculação subcutânea ou intramuscular de veneno na vítima. O sangramento, no sítio de inoculação do veneno, é frequentemente observado, porém sua presença nem sempre indica comprometimento sistêmico, também ocorrendo o edema precocemente, sendo firme, rígido, com coloração violácea em decorrência do sangramento subcutâneo (França e Malaque, 2003). Já o quadro clínico sistêmico apresenta pequenos sangramentos, sem repercussão hemodinâmica, sendo comum gengivorragia, hematúria microscópicas, púrpuras e sangramentos em feridas recentes (Kamiguti, 1991).

O tratamento é feito utilizando o antiveneno, sua indicação baseia-se nos critérios clínicos de gravidade. O antiveneno tem sido utilizado mesmo tardiamente no acidente botrópico. A demonstração da presença do veneno botrópico no soro de pacientes, num período superior a 72 horas após o acidente, mostra a necessidade da administração de soro antibotrópico, mesmo após a admissão tardia da vítima ao atendimento hospitalar.(Barral-Netto, 1991). Entretanto, permanece ainda por ser definido até quando a soroterapia ainda é benéfica.

A presença do edema e sua extensão, é utilizada como critério de gravidade, mas a utilização desse critério como única variável na avaliação deve ser feito de modo criterioso, sendo que a capacidade neutralizante do processo inflamatório pelo antiveneno é limitada. É discutível a administração de dose adicional de antiveneno aos pacientes, baseado apenas na progressão do edema (França e Malaque, 2003).

A constatação de que a eficácia dos antivenenos na neutralização dos efeitos locais é limitada (Gutierrez ET AL., 1998; Homma e Tu, 1970), abre espaço para investigações sobre possíveis drogas a serem associadas à soroterapia (Leon ET AL., 1998; Rucavado ET AL., 2000).

Com isso neste trabalho pode ser visto até que ponto proteínas endógenas são passíveis de sofrer a ação de proteases como no caso do envenenamento e, após sua digestão gerarem peptídeos bioativos que podem atuar sobre o hospedeiro, acarretando efeitos não relacionados aos componentes do veneno e ainda não descritos. Assim, verificou-se que é possível as enzimas proteolíticas presentes no veneno de *B. jararaca* gerarem compostos ativos sobre componentes endógenos.

Neste trabalho foi visto que é possível a obtenção desses peptídeos bioativos a partir de serinoproteinases, como já foi publicado por outros autores, como Richter et al. (1999), que afirmam ser possível a obtenção de peptídeos bioativos pela proteólise de macromoléculas endógenas. Esses componentes podem ter origem bacteriana, fúngica e podem ser provenientes da ação de venenos animais, como de serpentes, vespas, anfíbios, entre outros. Esses peptídeos encontram-se na forma inativa dentro das cadeias polipeptídicas das proteínas originais, chamadas de precursores peptídicos.

Atualmente existem trabalhos publicados mostrando que os peptídeos bioativos não são provenientes somente de proteínas precursoras, mas podem ser provenientes de cripteínas, como Ueki et al., (2007) que sugerem que os peptídeos bioativos podem estar 'escondidos' nas proteínas de vários organismos, no entanto, podem não estar envolvidos na regulação fisiológica. Smith *et al.* (2006) nomearam este processo de busca por peptídeos bioativos produzidos pela digestão enzimática de várias proteínas, como criptoma.

Segundo Pimenta e Lebrun (2007), o criptoma é um subconjunto único de proteínas que tem a capacidade de gerar peptídeos bioativos, quando submetidos à clivagem proteolítica, em vez dos caminhos de transformação clássica.

Utilizando a digestão enzimática, Tsuruki *et al.* (2003) encontraram o 'soymetide', um peptídeo derivado da soja  $\beta$ -conglícinina pela digestão triptica, sendo um promotor de fagocitose de neutrófilos.

Baseado nesta nova classificação, foram utilizados substratos que primeiro foram hidrolisados com tripsina. A tripsina foi utilizada como proteína padrão de hidrólise para que pudéssemos através de um estudo comparativo compreender o mecanismo de geração de peptídeos bioativos utilizando serinoproteases do veneno botrópico como modelo de estudo.

Os substratos foram escolhidos por sua biodisponibilidade, ou seja, quais destes tem mais acessibilidade com o veneno no momento da picada. Portanto foram escolhidos os seguintes substratos; presente na pele, o colágeno; no músculo, mioglobina; na circulação, hemoglobina e presente na resposta imune a Fc IgG, apesar de atualmente o soro ser fabricado somente com a porção F(ab), na tentativa de diminuir as reações adversas (Otero et al, 1998), mas há estudos que demonstram que não há vantagem na clivagem enzimática das imunoglobulinas com relação ao poder neutralizante e especificidade em soros produzidos com a molécula de IgG ou F(ab')<sub>2</sub> contra o veneno de Bothrops (Leon et al, 2001). Assim a porção Fc IgG tem a capacidade de ligar-se a componentes do sistema complemento (Basta & Dalakas, 1994; Basta, 1996). Sendo assim alguns efeitos do envenenamento não são provenientes somente do veneno, mas também de possíveis peptídeos obtidos através da hidrólise destes substratos pela ação da serinoprotease do veneno de *B. jararaca*.

Destes substratos utilizados, o que gerou melhor hidrólise foi a mioglobina, sendo esta, uma proteína bastante utilizada como padrão para espectrometria de massa, juntamente com a tripsina (Zaia et al, 1992). A hidrólise da mioglobina com a tripsina permitiu a obtenção de alguns peptídeos

que puderam ser comparados com os peptídeos gerados para padrão de espectrometria de massas (Zaia et al, 1992).

Além da mioglobina, a hemoglobina também apresentou um bom resultado na geração de peptídeos bioativos, mostrando que foi possível isolar dois peptídeos com atividade proliferativa em células Fn1, sendo um deles com maior atividade. Já existe publicado alguns trabalhos descrevendo o tratamento proteolítico da hemoglobina gerando uma série de peptídeos, como no trabalho de Brantl *et AL.* (1986), que encontrou uma série de peptídeos, denominados hemorfinas com atividades similares a opióides.

Somente em 1990 se tornou claro que a hemoglobina serve *in vivo* como poderosa fonte de peptídeos bioativos que deve ter um papel profundo na homeostase, como descrito por Ivanov *et al.* (1997).

Diferentemente da mioglobina e da hemoglobina, o colágeno tipo I e a porção Fc da cadeia pesada da imunoglobulina G (Fc IgG), que também foram utilizados neste trabalho, não apresentaram obtenção de peptídeos bioativos significantes. Houve a geração de peptídeos, mas estes não puderam ser testados como peptídeo puro devido ao baixo rendimento da hidrólise. Esse baixo rendimento pode ser dado, talvez, pelo tempo da hidrólise desses substratos.

Existem 24 tipos de colágeno e cada um deles apresenta características próprias, tanto em sua natureza química como no padrão de organização estrutural. As moléculas de colágeno também estão envolvidas, direta ou indiretamente, na adesão e diferenciação celular, quimiotaxia e outras funções importantes para o desenvolvimento e funcionamento do organismo (Bateman, 1996). Existem na literatura, trabalhos que mostram a atividade dos fragmentos gerados por proteólise derivados do colágeno tipo IV, XV e XVIII, da membrana basal, que está envolvido com reguladores de angiogenese (Marneros & Olsen, 2001).

Com os peptídeos obtidos da mioglobina e da hemoglobina, foram realizados testes em células, gerando um resultado positivo para atividade celular proliferativa, sendo que para mioglobina chegou-se até 3 (três)

peptídeos isolados e puros, sendo um deles sintetizado. Já os peptídeos da hemoglobina, foram testados puros, mas não foi possível determinar a sequência, pois o tempo de retenção muito curto, assim quando analisado pelo sequenciador, pela técnica de degradação de Edman, tem a interferência de alguns aminoácidos livres.

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre esses peptídeos, foram utilizados programas de bioinformática para a caracterização das propriedades físico-químicas dos peptídeos, analisando massa molecular, PI, número de aminoácidos e polaridade. Com isso foi possível verificar que os peptídeos eram totalmente diferentes, o peptídeo 24 é constituído por 9 aminoácidos, possuindo característica hidrofílica. Já o peptídeo 27 é constituído por 16 aminoácidos e possui característica anfipática, e por fim o peptídeo 28, que foi sintetizado devido ao seu baixo rendimento, que é constituído de 6 aminoácidos, tendo característica hidrofóbica.

Além da caracterização das propriedades físico-químicas, foi também analisado por bioinformática a localização desses peptídeos na molécula íntegra, no caso a mioglobina. Com essa análise foi possível observar que esses peptídeos encontram-se na parte externa da proteína, assim sendo realmente um alvo mais evidente para as serinoproteases do veneno de *B. jararaca*.

Com o peptídeo da hemoglobina e os peptídeos da mioglobina, foi observado a porcentagem da indução de proliferação celular pela técnica de MTT, um método colorimétrico fundamentado na capacidade de enzimas do tipo succinato desidrogenases, presentes na mitocôndria, quando as células viáveis degradam o substrato fornecido pelo reagente MTT (Mosman, 1983; Wilson, 2000). Com esta metodologia foi possível observar, em cultura de célula FN1, que houve proliferação celular desde a concentração de 0,159 µg/mL até 5,09 µg/mL do peptídeo da hemoglobina e do peptídeo 24 da mioglobina. A melhor atividade foi na concentração de 2 µg/mL, sendo que nas outras concentrações também houve proliferação celular. Por outro lado, a melhor atividade foi na concentração inicial do 27, a melhor atividade foi na concentração inicial de 1,66 µg/mL e no 28 a melhor atividade foi obtida com a

utilização de 0,25 µg/mL, assim com o peptídeo sintético foi visto que a atividade proliferativa se confirma, tendo uma melhor atividade nas concentrações de 0,25 e 0,5 µg/mL.

Nas culturas de células da linhagem endotelial, HUVEC's, os peptídeos da mioglobina também apresentaram a atividade de proliferação celular, sendo que com a utilização do peptídeo 24 a melhor atividade proliferativa foi observada obtida na concentração de 1 µg/mL, com o peptídeo 27 a melhor atividade foi obtida na concentração de 0,41 µg/mL e como já havia sido visto que o peptídeo 28 e o sintético possuem a mesma atividade, como deveria ser, foi utilizado nas HUVEC's o peptídeo sintético, onde foi obtido a melhor atividade na concentração de 0,25 µg/mL.

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a ação destes peptídeos foi realizado a avaliação da degradação oxidativa dos ácidos graxos presentes no sobrenadante das células (lipoperoxidação lipídica –LPO) tratadas com o peptídeo da hemoglobina (dados não mostrados). A lipoperoxidação lipídica é iniciada pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagada por radicais peroxilas, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como malonaldeído, 4-hidroximonenal e isopostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para se avaliar o estresse oxidativo (Lima et al, 2001).

Para isso, foi utilizada a técnica de Ohkawa et al (1979), baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), predominantemente o malonaldeído, que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Baseado nesta técnica foi visto que quando utilizou-se o peptídeo da hemoglobina não houve uma significativa degradação oxidativa dos ácidos graxos. Por outro lado, na concentração de 5,09 µg/mL houve um aumento da quantidade da degradação oxidativa dos ácidos graxos, medida de nmol MDA/mL. Diferente do peptídeo da mioglobina que foi obtido uma quantidade significativa de nmol MDA/mL que o controle (dados não mostrados).

A maioria dos estudos biológicos de LPO, envolvem metais de transição, e é geralmente aceito que o ferro é fundamental para catalisar mudanças

oxidativas nos tecidos (Gutteridge e Halliwell, 1990). Por outro lado, o mecanismo pelo qual a mioglobina induz peroxidação de ácidos graxos polinsaturados ainda é uma questão de disputa, Baron e Andersen (2002), sugerem que a peroxidação induzida pela presença de mioglobina é altamente dependente do pH.

Depois de obtidos os peptídeos bioativos pela ação da tripsina, foi então feito a hidrólise da mioglobina com pSPBJ, lembrando que foi o substrato que obteve melhor rendimento com a tripsina. Para essa hidrólise foi feita uma cinética de hidrólise utilizando pSPBJ, onde constatou-se que o melhor tempo de hidrólise foi o 36 horas, baseado na análise do perfil cromatográfico feito por CLAE.

Com isso, esta hidrólise foi possível observar que também houve a obtenção dos peptídeos, e se comparado ao perfil do hidrolisado de mioglobina com tripsina, é possível ver a semelhança. O cromatograma mostrou a eluição de peptídeos com tempos de retenção muito semelhantes, indicando dessa forma, que a hidrólise com pSPBJ pode gerar peptídeos com potencial bioativo sobre a mioglobina.

Dessa forma, utilizando a clivagem de vários substratos utilizando tripsina como molécula de referência, esse estudo permitiu a padronização detalhada de testes que viabilizem a utilização da pSPBJ como modelo para geração de peptídeos bioativos em cultura celular, a partir da hidrólise de diferentes substratos. A padronização foi detalhadamente realizada utilizando a tripsina como molécula de referência para estudos futuros com pSPBJ. Ensaios futuros em culturas celulares poderão contribuir para a compreensão do fenômeno do envenenamento botrópico a partir da ação de serinoproteases na hidrólise de substratos endógenos, gerando peptídeos bioativos (criptídeos).

## 7. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, até o presente momento, neste trabalho pode-se concluir previamente que:

- ✓ A mioglobina e a hemoglobina tem em sua estrutura, peptídeos que ao serem liberados pela hidrólise apresentam atividade proliferativa.
- ✓ Os peptídeos gerados pela hidrólise de mioglobina utilizando a tripsina tiveram atividade em cultura de célula FN1 e HUVEC's.
- ✓ Os peptídeos gerados pela hidrólise da hemoglobina, utilizando a tripsina tiveram atividade em cultura de célula FN1
- ✓ Os aspectos físico-químico destes peptídeos provenientes da hidrólise da mioglobina apresentaram diferenças sendo hidrofílico (24), hidrofóbico (28) e anfipático (24).
- ✓ A localização dos peptídeos na proteína integra, viu-se que os peptídeos estão na parte externa da proteína.
- ✓ A trispina pode ser utilizada como serinoproteinase de referência, visto que tanto a tripsina quanto a serinoproteinase isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, gerou frações peptídicas semelhantes quanto ao seu perfil de hidrólise pelo tempo de retenção.

## 8. Referência bibliográfica

Autelitano DJ, Rajic A, Smith AI, Berndt MC, Ilag LL, Vadas M. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Drug Discov Today* 2006,11:306-14.

Baron CP., Andersen HJ. Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50(14):3887-97.

Barral-Neto M, Schriefer A, Barral A, Almeida AR, Mangabeira A. Serum levels of bothropic venom in patients without antivenom intervention. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991, 45(6):751-4.

Basta M, Dalakas MC. High-dose intravenous immunoglobulin exerts: its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J. Clin. Invest.* 1994,54:1729-35.

Basta M. Modulation of complement-mediated immunodamage by intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol.* 1996, 104:21-6.

Bateman JF, Lamandé SR, Ramshaw JAM. Collagen Superfamily. In Comper WD (ed) *Extracellular Matrix: Molecular components and interactions*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 1996

Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac.Ther.*1994, 62:325-372.

Bode, W.; Gomis-Ruth, F.; Stocker, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the metzcins. *FEBS Lett.*, 1993, 331:134-140.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*1976, **72**:248-54.

Brantl, V., Gramsch, C., Lottspeich, F., Mertz, R., Jaeger, K. H., and Herz, A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Eur. J. Pharmacol.* 1986, 125, 309– 310.

Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie.* 2000, (82) 851-859.

Cabral GA. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Sciences.* 2005, 77(14):1699-710.

Cardoso, JLC; França, FOS; Wen, FH; Málaque, CMS; Haddad, VJr. *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* São Paulo: Sarvier, 2003.

Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 1998, 36:823-46.

Craik CS, Largman C, Fletcher T, Rocznaidk S, Barr PJ, FletteRick R, et al. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science* 1985, 228:291-297.

Doley R, Kini M. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, 66:2851-2871.

Edman P. Method for determination of amino acid sequence in peptides, *Acta Chem. Scand.* 1950, 10:761-768.

Farsky SH, Walber J, Costa-Cruz M, Cury Y, Teixeira CF. leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon.* 1997;35(2):185-93.

Farsky SH, Gonçalves LRC, Gutiérrez JM, Correa AP, Rucavado A, Gasques P, et al. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. *Med. Inflamm.* 2000, 9:213-21.

Ferreira SH. A bradykinin – potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Farmacol. Chemother.* 1965;24:163-9.

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. *FEBS J.* 2008, 275:3016-3030.

França FOS, Málaque CMS. Acidente Botrópico In: *Animais Peçonhentos no Brasil.* Sarvier, São Paulo. 2003, 72-86.

Gonçalves LRC, Mariano M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Med Inflamm.* 2009,9(2):101-7.

Gutierrez JM, Lomonte B, Léon G, Rucavado A, Chaves F, Yamileth A. Trends in snakebite therapy: scientific. Technological and public health considerations. *Curr. Pharm. Desig.* 2007, v. 13, p. 1-16. Review.

Gutierrez JM, Theakston RD, Warrell DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med* 2006, 3:150.

Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and Mechanism of lipid peroxidation in biological system. *Trends Biochem. Sci.* 1990, 15, 129-135.

Gutiérrez JM, Leon G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon.* 1998;36(11):1529-38.

Hite LA, Jia LG, Bjarnason JB, Fox JW. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem Biophys.* 1994, 308:182-191.

Homma M, Tu AT. Antivenin for the treatment of local tissue damage due to envenomation by Southeast Asian snakes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1970;19(5):880-4.

Ivanov VT, Karelin AA, Philippova MM, Nazimov IV, Pletnev VZ. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: The concept of tissue-specific peptide pool. *Biopolymers.* 1997; 43(2):171-88.

Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. *Toxicon* 1991; 29(8):961-72.

Karasch MC. A vida dos escravos no Rio de Janeiro (1808-1850). São Paulo: Companhia das Letras, 2000:497-503.

Kini RM, Evans HJ. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 1990;28:1387-422.

Kitts DD. Bioactive substances in food: identification and potencial uses. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994, 72(4):423-434.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran. *Patologia- Bases patológicas das doenças*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Kunitz M. *J. gen. Physiol.* 1946, 30, 291.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227:680-85.

Lenhinger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lenhinger: Princípios de Bioquímica*. 3.ed. São Paulo: Savier, 2000.

Leon G, Estrada R, Chaves F, Rojas G, Ovadia M, Gutiérrez JM. Inhibition by CaNa<sub>2</sub>EDTA of local tissue damage induced by Bothrops asper (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. *Toxicon*, 1998;36(2):321-31.

Leon G, Monge M, Rojas E, Lomonte B, Gutiérrez JM. Comparison between IgG and F(ab')<sub>2</sub> polyvalent antivenoms: neutralization of systemic effects induced by Bothrops asper venom in mice, extravasation to muscle tissue, and potencial for induction of adverse reactions. *Toxicon* 2001; 39(6):793-801.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2001; 37(3):293-303.

Lomonte B, Gutiérrez JM. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre La caseína. *Ver. Biol. Trop*; 1983; 31 (1): 3740.

Mares-Guia M, Shaw E. Studies on the active Center of trypsin; the binding of amidimes and guanines as models of the substrate side chain. *J. Biol. Chem.* 1965;240,1579-1585.

Markland Jr. FS. Snake venoms. *Drugs.* 1997, 54, 1 -10.

Marneros AG, Olsen BJ. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol.* 2001 Sep; 20(5-6):337-45.

Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1477:146-156.

Melgarejo AR. Serpentes Peçonhentas no Brasil, In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* São Paulo: Savier; 2003:289-309.

Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 1963, 85(14):2149 – 2154.

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009.

Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional da Saúde. 2001.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods.* 1983; 65 (1-2): 55–63.

Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JM, Politi V, Crampton JM, et al. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26(9):2000-5.

Murayama N, Hayashi MA, Ohi H, Ferreira LA, Hermann VV, Saito H, et al. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:1189-93.

Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M, et al. Biochemistry 1994, 33:1843-1849.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 1979;95:351-358.

Otero R, Furtado MF, Goncalves C, Nunez V, Garcia ME, Osorio RG, et al. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. Toxicon 1998; 36(12):2021-7.

Perales J, Amorim CZ, Rocha SLG, Domont GB, Moussatché H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antiothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. Agentes Actions. 1992;37:250-9.

Pimenta DC, Lebrun I. Cryptides: buried secrets in proteins. Peptides. 2007 Dec; 28(12):2403-10.

Pirkle H. Thrombin-like enzymes from snakes venoms: an updated inventory. Thromb. Haemost. 1998;79, 675-683.

[Ponce-Soto LA](#), [Bonfim VL](#), [Novello JC](#), [Navarro Oviedo R](#), [Yarlequé Chocas A](#), [Marangoni S](#). 2007. Protein J. Sep; 26(6):387-94.

Richter R, Schulz-Knappe P, Scharder M, Ständker L, Jürgens M, Tammen H, et al. Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides. J. Chromatogr.B. 1999, 726(1-2):25-35.

Roberts, PR & Zaloga, GP.: Dietary bioactive peptides. New Horiz 1994, 2(2): 237-43.

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

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl W, Buckley EE, Deulofeu V, editors. Venomous animals and their venoms. New York: Academic Press, 1971:345-841.

Rucavado A, Escalante T, Teixeira CF, Fernandes CM, Diaz C, Gutiérrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. Med Inflamm. 2002;11:121-8.

Rucavado A, Escalante T, Franceschi A, Chaves F, Leon G, Gury Y, Ovadia M, et al. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa<sub>2</sub>EDTA. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2000;63(5-6):313-9.

Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD, Warrel DA. Haematological evaluation of patients bitten by the Jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. Toxicon 2008, 51:1440-1448.

Santoro ML, Sano-Martins IS. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. Thromb. Haemost. 2004, 92:369-383.

Seegers WH, Ouyang C. In: Lee, C.Y. (Ed). Snake venoms and blood coagulation Handbook of experimental pharmacology. 1979, 52:684-750.

Segura A, León G, Su CY, Gutiérrez JM, Burnouf T. Assessment of the impact of solvent/detergent treatment on the quality and potency of whole IgG equine antivenom. Biologicals, 2009, 37:306-312.

Serrano SM, Mentele R, Sampaio CA, Fink E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. Biochemistry 1995, 34:7186-7193.

Serrano SMT, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology VS. Substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon 2005, 45:1115-1132.

Smith AI, Autelitano DJ, Rajic A, Berndt MC, Ilag LL, Vadas M. In proceedings of the international Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4<sup>th</sup> Peptide Engineering Meeting 43JPS/PEM4; Ishida, H; Mihara, H., Eds.; The Japanese Peptide Society: Osaka, Japan, 2006; pp 316.

Talhout R, Engberts JBFN. Thermodynamic analysis of binding of p-substituted benzamidine to trypsin. Eur. J. Biochem., Netherlands, 2001, 268;1554-1560.

Teixeira CFP, Fernandes CM, Zuliani JP, Zamuner SF. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005, 100(1):181-184.

Trebien HA, Calixto JB. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. Agents Actions. 1989;26(3-4):292-300.

Tsuruki T, Kishi K, Takahashi M, Tanaka M, Matsukawa T & Yoshikawa M. Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean  $\beta$ -conglycinin, is an fMLP agonist. FEBS Lett (2003) 540: 206–210.

Ueki N, Someya K, Matsuo Y, Wakamatsu K, Mukai H. Cryptides: functional cryptic peptides hidden in protein structures. Biopolymers 2007; 88:190-8.

Warrel DA. Snake venom in science and clinical medicine. 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. Trans R Soc. Trop Med Hyg. 1989; 83(6): 732-40.

Wilson AP. Cytotoxicity and viability assays in animal cell culture: a practical approach. Oxford university press, 2000.

Yousef GM, Kopolovic AD, Elliot MB, Diamandis EP. Genomic overview of serine proteases. Biochemical and Biophysical Research Communications v. 2003, 305:28-36.

Zaia J, Annan RS, Biemann K. The correct molecular weight of myoglobin, a common calibrant for mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1992 Jan; 6 (1):32-6.

Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira AS, Teixeira CF. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon*.2001;39:1505-13.

## Anexos

Anexo 1: Certificado do Comitê de ética em pesquisa animal



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

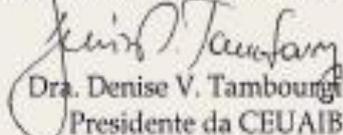
## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento de peptídeos bioativos pela ação de serinoproteases do veneno de *B. jararaca* sobre substratos endógenos e suas ações em cultura de células e bioensaios", protocolo nº 577/09, sob a responsabilidade de Ivo Lebrun e Aline Vivian Vatti Auada, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO (SBCAL/cobea) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 04/03/2009.

We certify that the research entitled "Isolation of bioactive peptides by the action of serinoproteases from the venom of *B. jararaca* on endogenous substrates and its actions in cell culture bioassays", protocol nº 577/09, under the responsibility of is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/04/2009

Vigência do Projeto: 03/2009 a 03/2011	Nº de animais/espécie
Laboratório de Bioquímica	Total: 300/Rato Wistar/macho
	Total: 50/ Cobalo/fêmea
	Total: 50/camundongo Balb/c/macho

São Paulo, 05 de Março de 2009.

  
Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

## Anexo 2: Artigo para publicação

# ISOLAMENTO DE CRIPTÍDEOS PELA AÇÃO DE TRIPSINA E SERINOPROTEASES DO VENENO DE *Bothrops jararaca* SOBRE MIOGLOBINA.

Auada AVV<sup>1,2</sup>, Batista IC<sup>1</sup>, Porto RM<sup>1</sup>, Melo RL<sup>3</sup>, Maria DA<sup>1</sup>, Kleber FA<sup>1</sup>, Azevedo RA<sup>1</sup>, Lebrun I<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Butantan – Laboratório de Bioquímica e Biofísica, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Secretaria de Estado de Saúde – Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto Butantan – Centro de Toxinologia Aplicada – CAT/CEPID, São Paulo, SP, Brazil

e-mail: [alinevivan@gmail.com](mailto:alinevivan@gmail.com)

## ABSTRACT

Serineproteases and metalloproteases are the main *Bothrops jararaca* venom enzymes acting on the victim's tissues and proteins. As a result of their direct actions on tissue proteins, these proteases could generate peptides with specific actions in cells or other mechanisms. The most common sources for bioactive peptides are natural precursor proteins. Recent studies have shown that a new class of proteins not named as precursors, the crypteins, may, in some conditions, originate bioactive peptides, or cryptides. New cryptides generated by the action of the venom serineproteases and by commercial trypsin on endogenous substrates, were isolated, then biochemically and biologically characterized. Serineproteases from *B. jararaca* venom were separated from the whole venom using an HPLC molecular exclusion column, verifying the activity of the fractions on the myoglobin. This substrate was incubated with the venom serineproteases as well as with trypsin. The resulting peptides were separated by fractionation by HPLC and the fractions were tested on cell cultures for proliferative or cytotoxic effects. Active fractions were rechromatographed in order to obtain the pure bioactive peptides. After the activity was confirmed, the peptides were sequenced and synthesized. Trypsin activity on myoglobin generated peptides (ALELFR, TGHPETLEK, GLSDGEWQQVLNVWGK) presenting proliferative activity on fibroblasts and endothelial cells. 3D modeling of myoglobin, using Cn3D software, showed that the three peptides are located on the surface of the protein. Digestion of myoglobin with the venom serineproteases generated an HPLC profile similar to the one obtained with trypsin. This suggests that the cryptides here described may indeed be generated at the the snake bite site, causing secondary effects,

not neutralized by serumtherapy. This study suggests that the venom serineproteases may generate cryptides with relevant effects through their actions on highly available protein substrates at the bite site.

## INTRODUÇÃO

As serpentes são animais que despertam grande interesse na sociedade pela capacidade que alguns grupos apresentam em causar acidentes graves. O Brasil possui uma fauna de serpentes composta por aproximadamente 265 espécies, classificadas dentro de aproximadamente 73 gêneros, em 9 famílias (Ministério da Saúde,2001)

Segundo Melgarejo (2003), o gênero *Bothrops* representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em todo território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias*).

Nos primeiros instantes após a picada, o acidente botrópico se evidencia com a presença de edema, dor e equimose na região da picada, que progride ao longo do membro acometido. As principais ações do veneno de *Bothrops jararaca* são: ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. Já as complicações locais são decorrentes da necrose e da infecção secundária que podem levar à amputação e/ou déficit funcional do membro. Também pode haver manifestações sistêmicas como, sangramento em pele e mucosas, hematúria, hematêmese e hemorragia em outras cavidades que podem determinar risco ao paciente. Estudos mostram que bioquimicamente essas complicações são resultados do consumo seqüencial dos fatores da coagulação, especialmente o fibrinogênio, com drástico aumento da fibrinólise, complexo trombina-antitrombina, presença de produtos da degradação do fibrinogênio (FfDP – Fibrinogen degradation products) e severa trombocitopenia (Kamigutti et al., 1991; Santoro ET AL., 2008; Santoro e Sano-Martins, 2004).

Apesar do baixo índice de letalidade dos acidente botrópicos, esses têm grande importância em saúde uma vez que podem resultar em severas complicações locais gerando sequelas permanentes como perda de função ou amputação do membro afetado (Gutierrez *et al.*, 2007).

Os venenos de serpente têm como seus componentes neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, fator de crescimento neural, lectinas, proteínas de ligação do fator de Von Willebrand (VWF), proteínas de ligação do fator IX/X,

disintegrinas, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP – Bradykinin-potentiating peptides), peptídeos natriuréticos, várias enzimas (exemplo: proteases, fosfodiesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidase, catalase, ATPase, hialuronidase, entre outras) e também enzimas inibitórias (Matsui, Fujimura e Titani, 2000).

Os envenenamentos causados pelas serpentes *Bothrops jararaca*, são caracterizados com fisiopatologia complexa incluindo danos teciduais rápidos e drásticos e manifestações sistêmicas (França e Málaque, 2003).

Os venenos de serpentes, particularmente das famílias *Viperidae* e *Crotalidae*, contém proteases que afetam a cascata de coagulação sanguínea e ajudam na digestão das presas. Embora a maioria delas serem farmacologicamente ativas por si só, algumas exigem componentes adicionais para exibir uma atividade ideal (Kini, 1990, Doley e Kini, 2009).

As metaloproteinases são enzimas abundantes em venenos de serpente da família Crotalines e Viperides. Elas são relevantes na fisiopatologia do envenenamento, sendo responsável pela ação local e sistêmica da hemorragia, freqüentemente observadas nas vítimas.

Portanto, as metaloproteinases têm suas ações gerais não apresentando alta seletividade pelo substrato como as serinoproteases.

As serinoproteases exibem preferência para catalisar a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a uma classe particular de aminoácidos. No grupo das enzimas semelhantes à tripsina, as proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo os aminoácidos básicos, arginina (Arg) e lisina (Lis), uma vez que elas têm um resíduo de aspartato ou glutamato no sítio de ligação do substrato, que pode formar uma forte ligação eletrostática com aqueles resíduos (Yousef *et al.*, 2003), assim como as serinoproteinases de mamíferos que regulam a hemostasia (Serrano e Marroun, 2005).

As serinoproteases desempenham um papel importante na regulação de muitos processos biologicamente relevantes, como por exemplo, a tripsina na digestão e a trombina na cascata da coagulação sanguínea. Esta classe de enzimas é um importante alvo na química medicinal contemporânea uma vez que, muitas doenças são decorrentes do mau funcionamento desta regulação. Assim, compostos que interagem especificamente com as serinoproteases podem ser úteis no tratamento de várias doenças (Talhout e Engberts, 2001).

Os peptídeos bioativos podem ser obtidos através de proteínas adquiridas na alimentação (Kitts, 1994). Além da digestão, é possível obter peptídeos bioativos pela proteólise de macromoléculas endógenas (Richter *et al.*, 1999), de origem bacteriana, fungos e/ou através da ação de venenos animais, como de serpentes, vespas, anfíbios, entre outros.

Segundo Autelitano *et al.* (2006), há evidências crescentes de que a clivagem proteolítica dá origem a peptídeos “escondidos” com atividade biológica que são muitas vezes imprevisíveis e totalmente distinta da proteína “precursora”. Um amplo espectro de proteases tem sido implicadas na geração de cripteínas naturais, que parecem desempenhar um papel na modulação de diversos processos biológicos, tais como a angiogênese, função imune e crescimento celular. A liberação proteolítica das cripteínas com novas atividades, representa um mecanismo importante para a crescente diversidade da função da proteína e, potencialmente, oferece novas oportunidades para a terapêutica utilizando como base as proteínas.

As cripteínas são definidas como proteínas que não são consideradas precursoras específicas para peptídeos bioativos, mas são capazes de, sob certas condições, gerar peptídeos bioativos com propriedades fisiológicas relevantes (Pimenta e Lebrun, 2007).

A atuação de proteases exógenas como as de venenos, bactérias ou proteases tóxicas sobre proteínas endógenas pode ter importância na geração de peptídeos que podem atuar como sinalizadores nos processos fisiológicos do indivíduo analogamente aos peptídeos bioativos gerados a partir dos precursores endógenos.

Baseado neste conceito avaliou-se até que ponto proteínas endógenas são passíveis de sofrer a ação de proteases como no caso do envenenamento e, após sua digestão gerarem peptídeos bioativos que poderiam atuar sobre o hospedeiro de forma indireta, acarretando efeitos não relacionados aos componentes do veneno e ainda não descritos.

Desta forma além das ações próprias do veneno, neste trabalho será possível verificar principalmente se as enzimas proteolíticas presentes no veneno da *Bothrops jararaca* são capazes de gerarem compostos ativos sobre a ação de componentes endógenos, o que explicaria, em parte, a ineficácia da

neutralização dos anticorpos contidos no soro antiofídico para algumas ações encontradas no envenenamento.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolamento de Serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca***

Para o isolamento das serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca* foi realizada uma cromatografia por exclusão molecular de acordo com Ponce-Soto (2007) com modificações. O procedimento foi realizado utilizando 10 mg do veneno total de *Bothrops jararaca* dissolvido em 400 µL de solução de bicarbonato de amônio 0,2 M com pH 8,1 e essa solução final do veneno dissolvido foi centrifugada por 2 (dois) minutos e o sobrenadante sendo reservado para aplicação no CLAE, que foi estabilizado com água ultra pura (Milli-Q) e depois com a solução de bicarbonato de amônio 0,2 M pH 8,1. Depois de estabilizado a coluna e a lâmpada UV à 280 nm, ressaltando que a coluna permaneceu refrigerada em banho de gelo, foi então injetado 320 µL da amostra, contendo 8 mg do veneno total. A análise da amostra foi programada para ter um tempo total de 145 minutos com 100% da concentração da solução de bicarbonato de amônio 0,2 M pH 8,1, com pressão máxima de 30 bar, fluxo de 0,3 mL/minutos, sendo monitorado no comprimento de onda de 280 nm e as frações foram coletadas no intervalo de 2 minutos, liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Esse procedimento foi realizado por 5 (cinco) vezes para obtenção da quantidade necessária de serinoproteases.

### **Atividade proteolítica das frações isoladas do veneno de *Bothrops jararaca***

Para determinação da atividade proteolítica das frações isoladas do veneno de *Bothrops jararaca* foi utilizado o método de Kunitz (1947) modificado por Lomonte & Gutierrez (1983). As amostras foram incubadas previamente com 100 µL de solução de EDTA 10 mM, com 1 mL de caseína 1% em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, durante 30 minutos a 37 °C. Após 30 (trinta) minutos foi adicionado 1 mL ácido tricloroacético (TCA) 5%, posteriormente submetidos à centrifugação a 23.500 g, durante 15 minutos sendo a densidade óptica dos sobrenadantes determinada em espectrofotômetro Ultrospec III, Pharmacia-

Biotech a 280 nm. Para determinar a atividade proteolítica das frações isoladas também foi realizado o mesmo experimento, mas utilizando uma caseína com fluoróforo (leitura com excitação à 365 nm e emissão à 525 nm) e também foi utilizado Benzoil-Arginil-p-nitroanilida (BAPNA) (leitura à 410 nm).

### **Hidrólise da mioglobina**

A mioglobina foi hidrolisada, primeiro utilizando a enzima tripsina (T) e depois também a mistura contendo as serinoproteases isoladas do veneno total de *B. jararaca* (pSPBJ – *pool* serinoproteases *Bothrops jararaca*). Para a hidrólise foi pesado 2 mg do substrato endógeno e dissolvido em solução de Tris/HCl 50 mM pH 8,0. O tubo contendo essa solução adicionado o substrato foi colocado no banho Maria à 37 °C e então adicionado a enzima de escolha, sendo que a tripsina foi adicionada em uma concentração de 100 µg e a mistura das serinoproteases do veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 200 µg. Antes de adicionar as serinoproteases no tubo com o substrato endógeno, foi adicionado 100 µL de solução de EDTA 10 mM, para inibir as metaloproteinases que poderiam gerar uma hidrólise não desejada. Em seguida, a amostra permaneceu em banho maria por 18 e 36 horas, para T ou pSPBJ, respectivamente. Esse tempo foi pré-estabelecido levando-se em conta a cinética de hidrólise. Esta cinética de hidrólise, que determinou o melhor tempo para geração de peptídeos, foi realizada coletando alíquotas das amostras incubadas seguindo os seguintes tempos: 0 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas e 24 horas. Essas alíquotas foram analisadas de acordo com seu perfil cromatográfico.

### **Precipitação dos hidrolisados**

Depois da hidrólise de 18 e 36 horas, utilizando tripsina e pSPBJ, respectivamente, os hidrolisados foram precipitados utilizando a solução de ácido acético 0,1 N, em banho de gelo, obedecendo a relação volume: volume (v:v), e 30 (trinta) minutos depois os hidrolisados foram centrifugados, em uma centrífuga SORVAL refrigerada à 4 °C, por 1 (uma) hora à 7.600 g, e o sobrenadante foi coletado e liofilizado, o precipitado foi descartado.

### **Purificação dos peptídeos obtidos pela hidrólise da mioglobina**

Uma alíquota da amostra hidrolisada e já precipitada foi injetada no CLAE para análise, sendo que o aparelho já estava programado para uma análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B, monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18, fase reversa. Os picos gerados foram coletados, liofilizados e armazenados a -20 °C. Esse procedimento foi realizado mais de uma vez para obter a quantidade necessária de material.

### **Sequenciamento de peptídeo**

Após a purificação dos peptídeos pelo método de CLAE, esses peptídeos foram submetidos ao sequenciamento por degradação de Edman. A degradação de Edman remove sequencialmente um aminoácido por vez da extremidade amínica do peptídeo. Esse peptídeo reage com fenilisotiocinato que se combina com o grupo amino do N-terminal, levando esse peptídeo à tratamento com ácido diluído em baixas temperaturas onde ocorre a remoção do resíduo N-terminal, que pode ser identificado por cromatografia. O restante da cadeia será submetida a outra série destas reações, permitindo a identificação do novo resíduo N-terminal. Assim a sequência pode ser determinada (Edman, 1950).

### **Síntese de peptídeos**

Os peptídeos, depois de seqüenciados, foram submetidos à síntese pelo método de fase sólida, utilizando um sintetizador automático, empregando a estratégia Fmoc. Essa estratégia é um processo pelo qual as transformações químicas podem ser realizadas em suporte sólido a fim de preparar uma vasta gama de compostos sintéticos (Merrifield, 1963).

### **Cultura de células**

As células foram distribuídas em placas e foram levadas para a incubadora a uma atmosfera de 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> e examinadas ao microscópio invertido, 3 vezes por semana. O meio de cultura foi trocado neste mesmo intervalo de tempo. Ao atingirem a confluência, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>. Ao atingirem a confluência nesta nova

garrafa foi desprezado o meio da garrafa e adicionado 2 mL de tripsina 0,4% para remover as células da superfície da garrafa. A tripsina foi retirada depois das células se soltarem e assim adicionou-se o meio RPMI com soro fetal bovino (SFB). As amostras de células foram transferidas para um tubo e esse foi centrifugado à 270 g por 10 minutos em centrifuga refrigerada à 5 °C. Depois de centrifugado o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de meio RPMI. Após homogeneização, a concentração de células foi ajustada para  $2 \times 10^5$  células por placa.

### **Teste de viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolol brometo]. Este método é baseado na redução do MTT a cristais de formazan pelas células vivas. Foi determinada a atividade proliferativa das suspensões das linhagens celulares, incubadas em placas de 96 poços. Foram adicionados 10 mL de MTT (5 mg/ml) às células, e estas incubadas por três horas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período, o meio foi removido e acrescentou-se 100 mL de álcool metílico para dissolver os cristais de formazana formados e precipitados. A quantificação da absorvância foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm (Wilson,2000; Mosman, 1983).

### **Análise por bioinformática**

Com os peptídeos obtidos foi feita uma análise utilizando três tipos de software de bioinformática, um para avaliar as características bioquímicas dos peptídeos (Programa Hidropathicity Plots, disponibilizado pelo site <http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>), outro software para análise das possíveis regiões de clivagem da proteína (Peptide Cutter, disponibilizado no site <http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/>) e foi utilizado o programa de modelagem, Cn3D que é um software de livre acesso, obtido pelo site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>), com esse programa foi feita a localização dos peptídeos na molécula íntegra de mioglobina.

## RESULTADOS

Nesta primeira etapa, foi realizada uma CLAE, por exclusão molecular, com tempo total de 145 minutos, onde a mistura do veneno total de *Bothrops jararaca* foi fracionado, com o objetivo de isolar a mistura contendo as serinoproteinases (pSPBJ). A coleta foi realizada a cada 2 minutos. As frações foram agrupadas seguindo a seguinte ordem: fração I (tempo 60 a 65), fração II (65 a 72), fração III (72 a 90), fração IV (90 a 99), fração V (99 a 105), fração VI (105 a 126) e fração VII (126 a 145), como pode ser visto na figura 1.

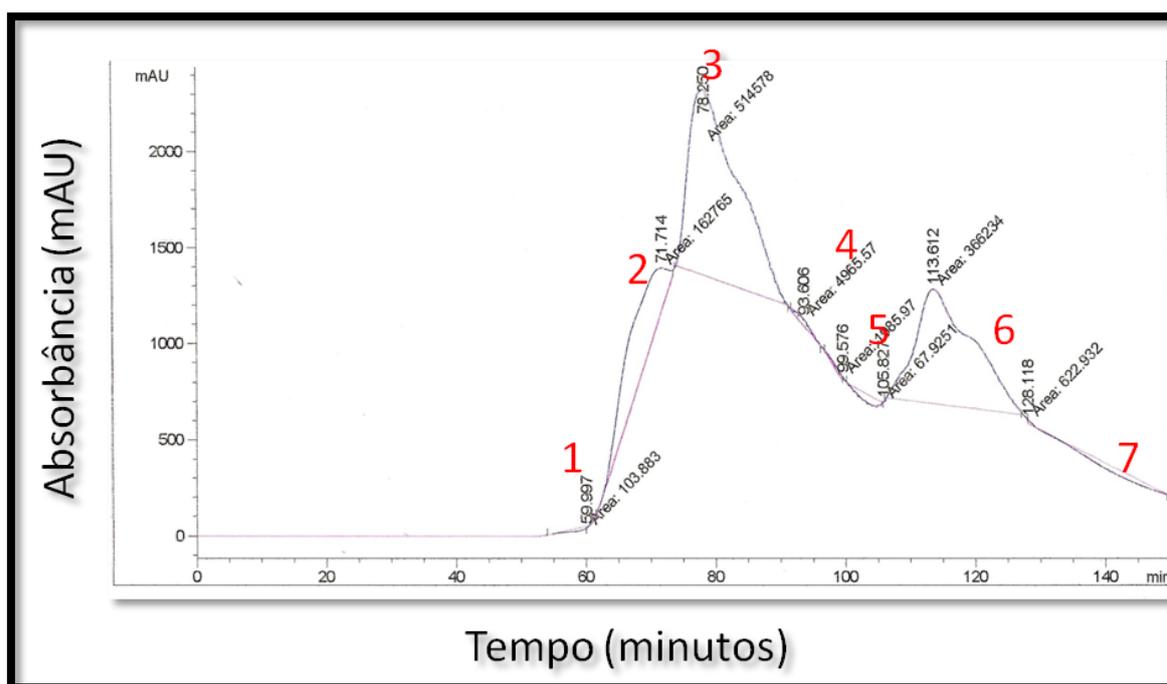


Figura 1 – Cromatograma obtido por CLAE, mostrando as frações coletadas, correspondente da mistura de serinoproteinases provenientes do veneno total de *Bothrops jararaca*, onde foram obtidas 7 (sete) frações, indicadas pelos números em vermelho, pelas linhas rosa observa-se as áreas das frações coletadas, mostrando começo e fim do pico em relação a fração. Esse cromatograma foi obtido a 280 nm, utilizando uma coluna de exclusão molecular, equilibrada e eluída com solução de bicarbonato de amônio 0,2 M pH 8,1, por 145 minutos com fluxo de 0,3 mL/minuto.

Posteriormente, essas frações foram analisadas em eletroforese (SDS-PAGE 15%), para avaliar a massa molecular das proteínas contidas nas frações coletadas. Há presença de contaminações entre as frações coletadas, mas sendo possível verificar a diferença entre as frações 2 e 3, onde na fração 2 observa-se uma banda mais concentrada entre 50 kDa a 120 kDa e na fração 3 uma banda concentrada entre 20 kDa a 40 kDa. A partir da fração 4 observa-

se que essas bandas que aparecem mais fortemente coradas permanecem aparecendo nas outras frações coletadas (figura 2). Para saber qual destas frações era a de interesse, no caso pSPBJ, avaliamos subsequentemente a atividade proteolítica das frações.

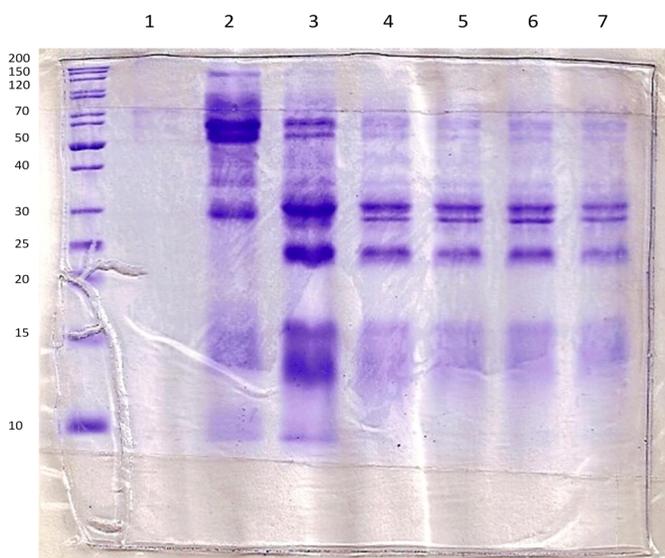


Figura 2 – Gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie R-250 mostrando as frações obtidas do veneno total de *Bothrops jararaca*. 1- Marcador de massa molecular – Fermentas. 2- Fração 1 proveniente do isolamento de serinoprotease. 3- Fração 2. 4- Fração 3. 5- Fração 4. 6- Fração 5. 7- Fração 6. 8- Fração 7.

A atividade proteolítica das frações obtidas por CLAE, foi avaliada utilizando diferentes substratos, com o intuito de localizar a fração de interesse, pSPBJ e foi determinado que a fração que continha a pSPBJ era a fração III (dados não mostrados).

Com isso, essa fração foi incubada com mioglobina. Da mesma maneira também foi incubado a mioglobina com tripsina, gerando frações peptídicas, que foram testadas previamente por teste de viabilidade celular para observar suas ações. Após os testes prévios, foram isoladas as frações peptídicas de interesse como mostra a figura 3.

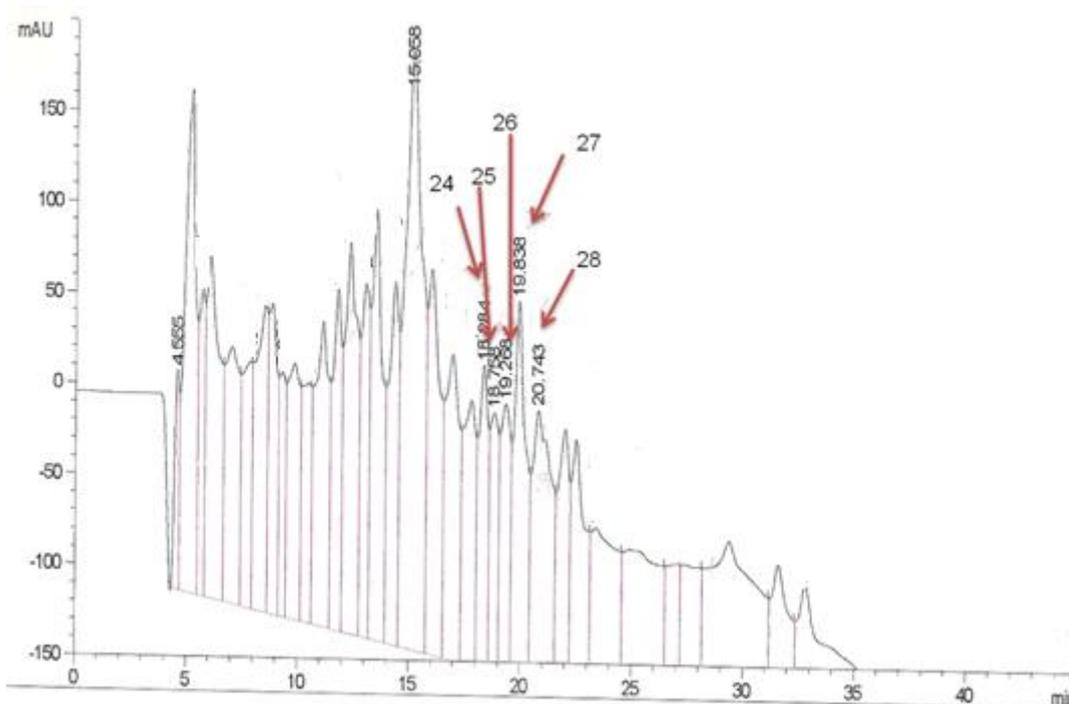


Figura 3 – Cromatograma do hidrolisado de mioglobina com T, por 18 horas. Análise de 45 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, com gradiente de 5% a 90% de solução B (90% de ACN com 10% de solução 0,1% TFA), monitorado com comprimento de onda de 214 nm, com pressão máxima de 300 bar, com coluna C18 fase reversa. Este cromatograma mostra a coleta dos picos referentes à fração VIII, da hidrólise de mioglobina com T, podendo visualizar pelas setas, quais são os picos coletados e seus respectivos números.

Estes picos coletados foram submetidos a seqüenciamento de aminoácidos. Somente os picos 25 e 26 não puderam ser seqüenciados, pois a concentração era baixa. Por outro lado, os peptídeos 24, 27 e 28 foram seqüenciados (tabela 1), sendo que o peptídeo 28 teve pouco rendimento por isso este foi sintetizado.

Tabela 1 – Sequência, obtida por degradação de Edman, dos peptídeos gerados pela hidrólise da mioglobina com T.

Pico da hidrólise de mioglobina com T	Sequência do peptídeo
Pico 24	TGHPETLEK
Pico 27	GLSDGEWQQVLNVWGK
Pico 28	ALELFR

Com a seqüência desses peptídeos foi realizada análises de bioinformática para maiores informações físico-químicas destes. Sendo que foi visto que o pico 24 é hidrofílico, o pico 27 é anfipático e o pico 28 é hidrofóbico. Assim para aprofundar o estudo sobre esses peptídeos foi realizado, com ajuda de um

programa de modelagem, a localização desses peptídeos na molécula íntegra da mioglobina (figura 4).

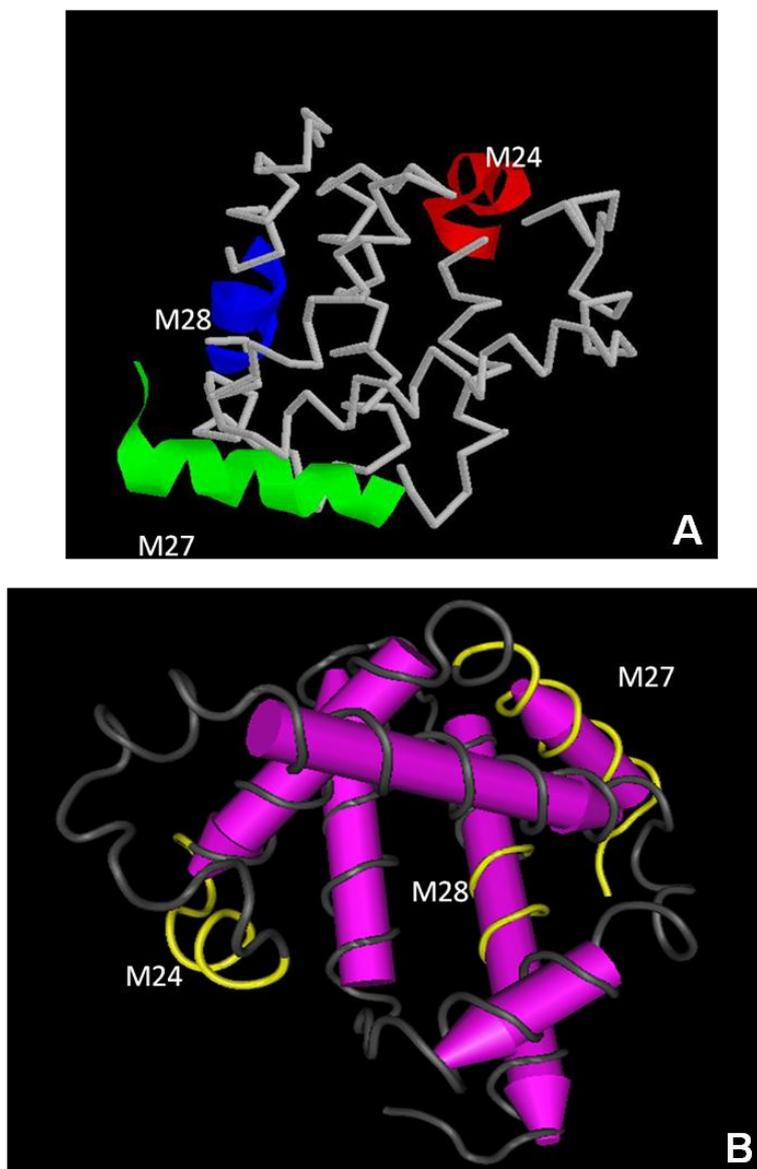


Figura 4 – A e B - Localização dos peptídeos, obtidos através da hidrólise da mioglobina com T, na proteína íntegra da mioglobina, utilizando um programa de modelagem, Cn3D.

Adicionalmente foi realizado o teste de viabilidade celular, em células do tipo Fn1. Com este teste de viabilidade celular foi possível observar que os peptídeos induziam a proliferação celular (figura 5, 6, 7).

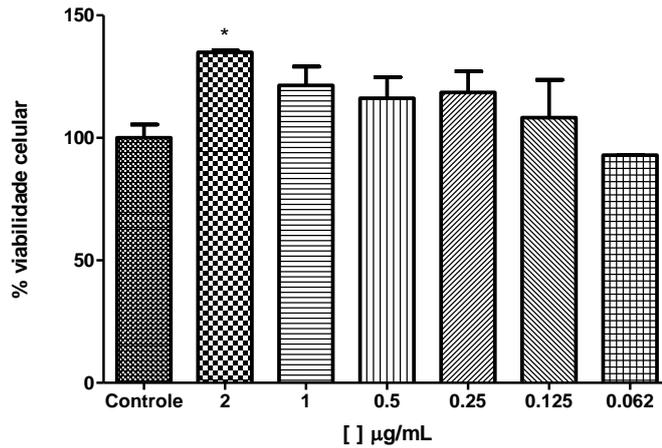


Figura 5 – Teste de MTT, utilizando o peptídeo 24 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

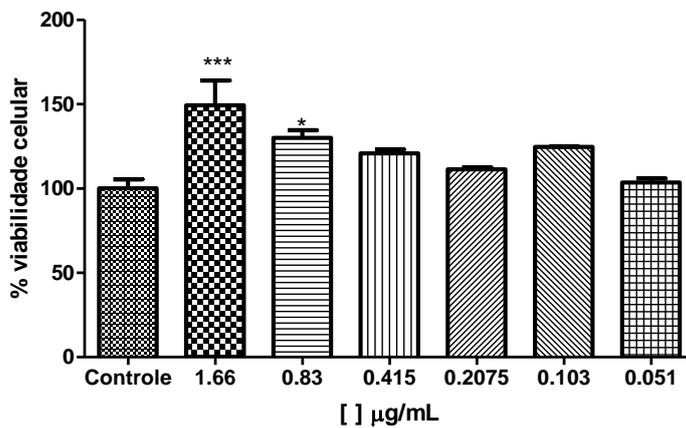


Figura 6 – Teste de MTT, utilizando o peptídeo 27 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

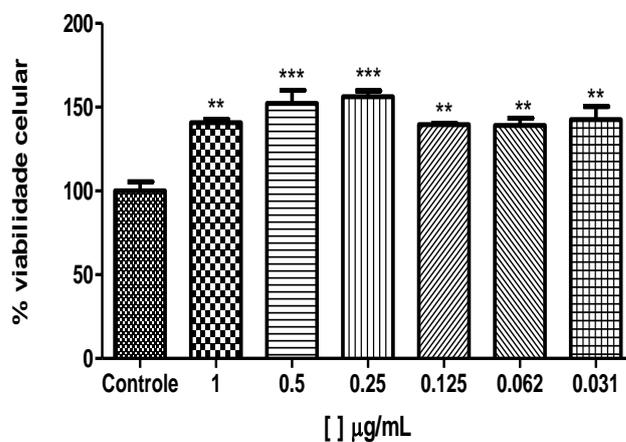


Figura 7 – Teste de MTT, utilizando o peptídeo 28 em diferentes concentrações em cultura de células do tipo Fn-1. Os resultados deste teste foram analisados pelo teste ANOVA com significância de  $P < 0,05$ .

Da mesma maneira que foi possível gerar peptídeos bioativos utilizando como enzima a tripsina, também pode-se observar a geração de frações peptídicas com tempo de retenção semelhante aos encontrados na hidrólise da mioglobina com a tripsina (figura 8).

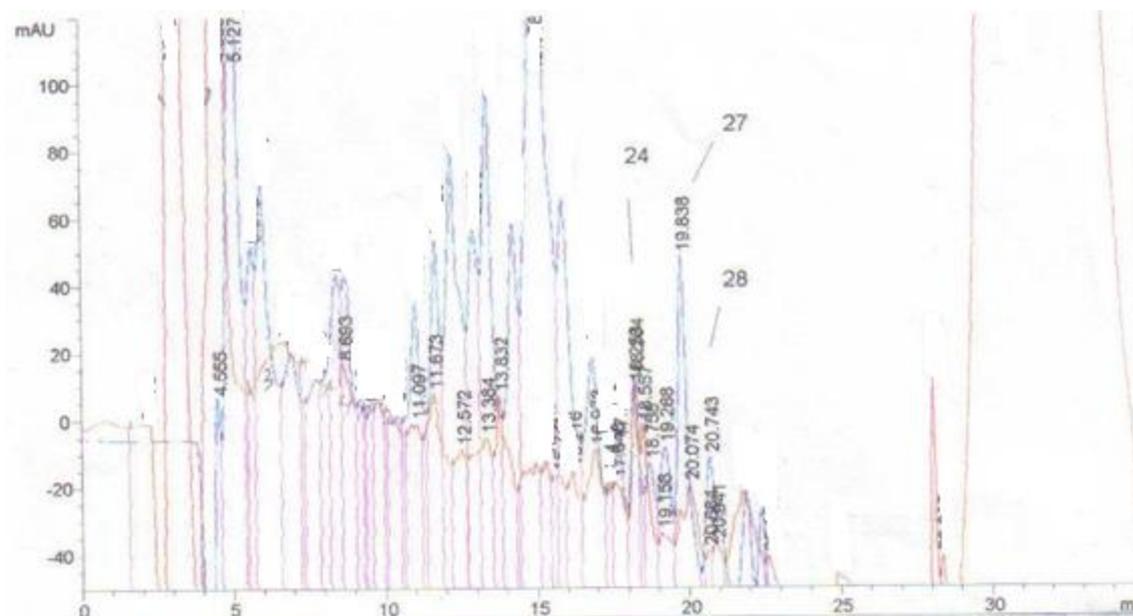


Figura 8 – Cromatograma comparativo das hidrólises de mioglobina com tripsina (traço azul) e pSPBJ (traço vermelho), por 18 e 36 horas respectivamente.

No geral, os perfis apresentaram um tempo de retenção semelhante, mas com relação aos picos encontrados na hidrólise utilizando a pSPBJ, foi determinado que esses picos seriam analisados através de sequenciamento de aminoácidos. Por outro lado, como a concentração destes picos apresentavam-se abaixo do necessário pelo aparelho de sequenciamento, foi preciso mudar a estratégia e posteriormente esses criptídeos serão sequenciados através de análise por espectrômetro de massas. Assim será possível avaliar a homologia existente entre os criptídeos gerados por T e os criptídeos gerados por pSPBJ.

## DISCUSSÃO

A constatação de que a eficácia dos antivenenos na neutralização dos efeitos locais é limitada (Gutierrez ET AL., 1998; Homma e Tu, 1970), abre espaço para investigações sobre possíveis drogas a serem associadas à soroterapia (Leon ET AL., 1998; Rucavado ET AL., 2000).

Com isso neste trabalho pode ser visto até que ponto proteínas endógenas são passíveis de sofrer a ação de proteases como no caso do envenenamento e, após sua digestão gerarem peptídeos bioativos que podem atuar sobre o hospedeiro, acarretando efeitos não relacionados aos componentes do veneno e ainda não descritos. Assim, verificou-se que é possível as enzimas proteolíticas presentes no veneno de *B. jararaca* gerarem compostos ativos sobre componentes endógenos.

Neste trabalho foi visto que é possível a obtenção desses peptídeos bioativos a partir de serinoproteinases, como já foi publicado por outros autores, como Rudolf et al. (1999), que afirmam ser possível a obtenção de peptídeos bioativos pela proteólise de macromoléculas endógenas. Esses componentes podem ter origem bacteriana, fúngica e podem ser provenientes da ação de venenos animais, como de serpentes, vespas, anfíbios, entre outros. Esses peptídeos encontram-se na forma inativa dentro das cadeias polipeptídicas das proteínas originais, chamadas de precursores peptídicos.

Atualmente existem trabalhos publicados mostrando que os peptídeos bioativos não são provenientes somente de proteínas precursoras, mas podem ser provenientes de cripteínas, como Ueki et AL., (2007) que sugerem que os peptídeos bioativos podem estar 'escondidos' nas proteínas de vários organismos, no entanto, podem não estar envolvidos na regulação fisiológica. Smith *et al.* (2006) nomearam este processo de busca por peptídeos bioativos produzidos pela digestão enzimática de várias proteínas, como criptoma.

Segundo Pimenta e Lebrun (2007), o criptoma é um subconjunto único de proteínas que tem a capacidade de gerar peptídeos bioativos, quando submetidos à clivagem proteolítica, em vez dos caminhos de transformação clássica.

Com os peptídeos obtidos da mioglobina e da hemoglobina, foram realizados testes em células, gerando um resultado positivo para atividade celular proliferativa, sendo que para mioglobina chegou-se até 3 (três) peptídeos isolados e puros, sendo um deles sintetizado. Já os peptídeos da hemoglobina, foram testados puros, mas não foi possível determinar a sequência, pois o tempo de retenção muito curto, assim quando analisado

pelo sequenciador, pela técnica de degradação de Edman, tem a interferência de alguns aminoácidos livres.

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre esses peptídeos, foram utilizados programas de bioinformática para a caracterização das propriedades físico-químicas dos peptídeos, analisando massa molecular, PI, número de aminoácidos e polaridade. Com isso foi possível verificar que os peptídeos eram totalmente diferentes, o peptídeo 24 é constituído por 9 aminoácidos, possuindo característica hidrofílica. Já o peptídeo 27 é constituído por 16 aminoácidos e possui característica anfipática, e por fim o peptídeo 28, que foi sintetizado devido ao seu baixo rendimento, que é constituído de 6 aminoácidos, tendo característica hidrofóbica.

Além da caracterização das propriedades físico-químicas, foi também analisado por bioinformática a localização desses peptídeos na molécula íntegra, no caso a mioglobina. Com essa análise foi possível observar que esses peptídeos encontram-se na parte externa da proetína, assim sendo realmente um alvo mais evidente para as serinoproteases do veneno de *B. jararaca*.

Depois de obtidos os peptídeos bioativos pela ação da tripsina, foi então feito a hidrólise da mioglobina com pSPBJ, lembrando que foi o substrato que obteve melhor rendimento com a tripsina. Para essa hidrólise foi feito uma cinética de hidrólise utilizando pSPBJ, onde constatou-se que o melhor tempo de hidrólise foi o 36 horas, baseado na análise do perfil cromatográfico feito por CLAE.

Com isso, esta hidrólise foi possível observar que também houve a obtenção dos peptídeos, e se comparado ao perfil do hidrolisado de mioglobina com tripsina, é possível ver a semelhança. O cromatograma mostrou a eluição de peptídeos com tempos de retenção muito semelhantes, indicando dessa forma, que a hidrólise com pSPBJ pode gerar peptídeos com potencial bioativo sobre a mioglobina.

Dessa forma, utilizando a clivagem de vários substratos utilizando tripsina como molécula de referência, esse estudo permitiu a padronização

detalhada de testes que viabilizem a utilização da pSPBJ como modelo para geração de peptídeos bioativos em cultura celular, a partir da hidrólise de diferentes substratos. A padronização foi detalhadamente realizada utilizando a tripsina como molécula de referência para estudos futuros com pSPBJ. Ensaios futuros em culturas celulares poderão contribuir para a compreensão do fenômeno do envenenamento botrópico a partir da ação de serinoproteases na hidrólise de substratos endógenos, gerando peptídeos bioativos (criptídeos).

## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a mioglobina tem em sua estrutura, peptídeos que ao serem liberados pela hidrólise apresentam atividade proliferativa. De acordo com os aspectos físico-químicos destes peptídeos provenientes da hidrólise da mioglobina que apresentaram diferenças sendo hidrofílico (24), hidrofóbico (28) e anfipático (24) e sua localização dos peptídeos na proteína íntegra (parte externa), pode-se afirmar que a tripsina pode ser utilizada como serinoproteinase de referência, visto que tanto a tripsina quanto a serinoproteinase isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, gerou frações peptídicas semelhantes quanto ao seu perfil de hidrólise pelo tempo de retenção.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Autelitano DJ, Rajic A, Smith AI, Berndt MC, Ilag LL, Vadas M. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Drug Discov Today* 2006;11:306-14.

Doley R, Kini M. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* (2009) 66:2851-2871.

Edman P. Method for determination of amino acid sequence in peptides, *Acta Chem. Scand.* 1950, 10, 761-768.

França FOS, Málaque CMS. Acidente Botrópico, 72-86. In: *Animais Peçonhentos no Brasil*. Sarvier, São Paulo. 2003.

Gutierrez JM, Lomonte B, León G, Rucavado A, Chaves F, Yamileth A. Trends in snakebite therapy: scientific. Technological and public health considerations. *Curr. Pharm. Desig.* 2007, 13:1-16.

Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* 1991; 29(8):961-72.

Kini RM, Evans HJ. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 1990;28:1387-422.

Kitts DD. Bioactive substances in food: identification and potencial uses. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994,72(4):423-434.

Kunitz M. *J. gen. Physiol.* 1946, 30, 291

Leon G, Estrada R, Chaves F, Rojas G, Ovadia M, Gutiérrez JM. Inhibition by CaNa<sub>2</sub>EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. *Toxicon*, 1998;36(2):321-31.

Lomonte B, Gutiérrez JM. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre La caseína. *Ver. Biol. Trop*; 1983; 31 (1): 3740.

Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1477:146-156.

Melgarejo AR. Serpentes Peçonhentas no Brasil, In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Savier; 2003, 289-309.

Merrifield, R. B. *J Am Chem Soc*,1963, 85, 2149 – 2154.

Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional da Saúde, 2001.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983; 65 (1-2): 55–63.

Pimenta DC, Lebrun I. Cryptides: buried secrets in proteins. *Peptides*. 2007 Dec; 28(12):2403-10.

Richter R, Schulz-Knappe P, Scharder M, Ständker L, Jürgens M, Tammen H, et al. Composition of the peptide fraction in human blood plasma: database of circulating human peptides. *J. Chromatogr.B*. 1999, 726(1-2):25-35.

Rucavado A, Escalante T, Franceschi A, Chaves F, Leon G, Gury Y, et al. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa<sub>2</sub>EDTA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000;63(5-6):313-9

Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD, Warrel DA. Haematological evaluation of patients bitten by the Jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon* 2008, 51, 1440-1448.

Santoro ML, Sano-Martins IS. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. *Thromb. Haemost.* 2004, 92, 369-383.

Smith AI, Autelitano DJ, Rajic A, Berndt MC, Ilag LL, Vadas M. In proceedings of the international Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4<sup>th</sup> Peptide Engineering Meeting 43JPS/PEM4; Ishida, H; Mihara, H., Eds.; The Japanese Peptide Society: Osaka, Japan, 2006; pp 316.

Talhout R, Engberts JBFN. Thermodynamic analysis of binding of p-substituted benzamidine to trypsin. *Eur. J. Biochem.*, Netherlands, 2001, 268:1554-1560.

Ueki N, Someya K, Matsuo Y, Wakamatsu K, Mukai H. Cryptides: functional cryptic peptides hidden in protein structures. *Biopolymers* 2007; 88:190-8.

Wilson AP. Cytotoxicity and viability assays in animal cell culture: a practical approach. Oxford university press, 2000.

Yousef GM, Kopolovic AD, Elliot MB, Diamandis EP. Genomic overview of serine proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 305:28-36.

## Anexo 3: Artigo publicado

## Determination of isotretinoin in pharmaceutical formulations by reversed-phase HPLC

Carla Aiolfi Guimarães<sup>1\*</sup>, Farid Menna<sup>2</sup>, Bouzid Menna<sup>3\*</sup>, Ivo Lebrun<sup>4</sup>, Joyce S. Quenca-Guillen<sup>1</sup>,  
Aline Vivian Vatti Auada<sup>4</sup>, Lucildes P. Mercuri<sup>5</sup>, Paula Ferreira<sup>5</sup>, Maria Inês Rocha Miritelle Santoro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Dermatology, School of Medicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany;

<sup>3</sup>Fluorotronics, Inc., 1425 Russ. Blvd, San Diego Technology Incubator, San Diego, USA;

<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, Butantan Institute, São Paulo, Brazil;

<sup>5</sup>Department of Exact and Earth Sciences, Diadema, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Email: [carlaaiolfi@usp.br](mailto:carlaaiolfi@usp.br); [bouzid.menna@gmail.com](mailto:bouzid.menna@gmail.com)

Received 4 February 2010; revised 1 March 2010; accepted 2 March 2010.

### ABSTRACT

The development of facile and rapid quantification of biologically active biomolecules such as isotretinoin in therapeutic drugs contained in many generic formulations is necessary for determining their efficiency and their quality to improve the human health care. Isotretinoin finds its applications in the maintenance of epithelial tissues. Different processes to date such as normal phase HPLC, or gas chromatography among others are able to separate and quantify isotretinoin. However, the extraction is quite complex and in the case of HPLC, the analysis requires long retention times. In such context, an isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) technique coupled with an UV-vis detector is described here for easy separation and quantification of 13-*cis*-retinoic (isotretinoin) from soft gelatin capsule formulations. The isotretinoin was extracted from three different commercial drug samples with tetrahydrofuran (THF) solvent by a procedure that can be completed in less than 10 minutes. Subsequent separation and quantification were accomplished in less than 5 minutes under isocratic reversed-phase conditions on a Lichrospher RP18 column and a mobile phase consisting of 0.01% TFA/acetonitrile (15/85, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. Isotretinoin was detected for the three samples via its UV-vis absorbance at 342 nm. The method was validated and the results showed good linearity, precision and accuracy for sensitive and selective quantitative determination of isotretinoin in the different pharmaceutical formulations. We found that the average isotretinoin content in two of the three commercial products fell outside the 90-110% United States Pharmacopeia specifications. Consequently, the facile extraction and the precise method for the biomole-

cule quantification open up tremendous possibilities in improving the quality control of drugs which can exist as different generic brands.

**Keywords:** 13-*Cis* Retinoic Acid; Reversed-Phase Chromatography; Isotretinoin Extraction; Isotretinoin Quantification; Pharmaceuticals Formulation

### 1. INTRODUCTION

Retinoic acid is a very potent biomolecule in promoting growth and controlling differentiation and maintenance of epithelial tissue for vitamin A deficient animals. Indeed, all-*trans*-retinoic acid (tretinoin) appears to be active form of vitamin A in all tissues except the retina, and it is 10-100-fold more potent than retinol in various systems *in vitro*. Isomerization of this compound in the body yields to 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin), which is nearly as potent as tretinoin in many of its actions on epithelial tissues. Vitamin A and other retinoids have found wide applications in the treatment of skin disorders and may find important roles in cancer chemoprevention and therapy [1].

One of the most clinically useful vitamin A derivatives is 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin). It was approved in 1982 to treat severe recalcitrant nodular acne and remains the drug of choice for this therapeutic treatment. Isotretinoin is the only treatment that affects all the major factors involved in the pathogenesis of acne. It exhibits several activities, in particular a capacity to decrease sebaceous gland activity, to correct the keratinization defect in acne and to reduce the population of the bacterium *Propionibacterium acne* [2].

Isotretinoin is a strong lipophilic molecule, almost insoluble in water and only partially soluble in oil. It is labile upon heating, light and air. In such conditions, these physicochemical properties impose considerable

limitations upon formulation options. For instance, the degradation of isotretinoin (in its solid state) in the presence of air is an autocatalytic process that proceeds rapidly and a simple dry powder formulation would not have a sufficient shelf-life. A suspension in oil is more stable [2]. Suspension in oil also minimizes chemical degradation, as lipid preparations, especially those with a low peroxide number, have been shown to enhance stability [3]. Owing to the photolability and sensitivity to heat and oxidation of the retinoids, their quantitative determination in pharmaceutical is particularly important for the quality control of finished products and for stability-indicating assays [1].

Indeed, for all pharmaceutical agents, one of the most important therapeutic determinants is the amount of drug the patient is exposed to. Previous studies comparing the quality of a variety of generic with innovator products have revealed important deficiencies in the amount of active ingredient among generics [4,5]. Isotretinoin and its trans-isomer, tretinoin, are known to be teratogens that can cause fetal malformations during pregnancy for instance [6,7]. It is possible for a patient to be treated with a different isotretinoin-based generic products during a course of therapy because of an assumption that "generic isotretinoin" are essentially identical and bio-equivalent to the innovator product. Under these circumstances, the pharmaceutical quality and consistency among products become of paramount importance [2].

A number of previous methods for determination of isotretinoin have been described in the literature. The analytical method generally employed in the United States Pharmacopoeia (USP) is a normal phase HPLC system [8]. Isotretinoin has also been determined by gas chromatography in soft and hard capsules formulations [9]. A reversed phase HPLC method with fluorescence detection has been described [1] for the determination of retinoids in pharmaceutical dosage forms. Simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations has been also reported via normal phase HPLC [10], HPLC [1], Microcalorimetry [11], UV radiation monitor [12], thin layer chromatography (TLC) and preparative layer chromatography (PLC) [13], capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (ME-KC) [14] have been also employed to study retinoid degradation products in commercial preparation and raw materials.

Although the above methods are able to separate and quantify isotretinoin, the extraction procedure is quite complex and HPLC analysis involves long retention times [10]. In that context, the aim of this study was to develop a rapid method using an isocratic high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to UV-vis detector to determine and quantify the isotretinoin in soft capsule formulations from three commercial samples. The validation method with its precision and accuracy was checked and the isotretinoin quantification was car-

ried out for three commercial products for which the content of the biomolecule was compared to the United States Pharmacopoeia specifications.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemicals and Reagents

The content of isotretinoin was determined from the concentrations of standard solutions. The standards for 13-*cis*-retinoic acid were from United States Pharmacopoeia reference standard (USP-RS). The three commercial products were purchased from two different pharmaceutical companies (their names have been omitted for commercial reasons) named as Branded Original Product A (Product A), Generic Product B (Product B) and Generic Product C (Product C). All three commercial soft-gel capsules contained 20 mg of isotretinoin. Acetonitrile, trifluoroacetic acid (TFA), tetrahydrofuran (THF) were HPLC grade and purchased from Merck (USA).

### 2.2. Laboratory Precaution

All experiments were performed using amber glass volumetric flasks under yellow light conditions to avoid degradation of isotretinoin.

### 2.3. HPLC Instrumentation and Conditions

The HPLC system consisting of Agilent model 1100 (Agilent, USA) connected to a UV/Visible absorbance detector (agilent) was used for all separation. Chromatographic separations were performed using reversed-phase chromatographic using a HPLC column [Lichrospher RP18 (5  $\mu$ m, 125  $\times$  4 mm i.d., Merck, USA)]. Isotretinoin was detected by the UV-vis absorbance at 342 nm [8] with the sensitivity set at 0.1 absorbance unit full scale (A<sub>u</sub>fu).

The mobile phase used was composed of 0.01% trifluoroacetic acid and acetonitrile (13/85, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 20  $\mu$ L and the column was maintained at 40°C.

### 2.4. Standard Preparation Procedures

Stock solutions were prepared by dissolving the appropriate amounts of isotretinoin in acetonitrile. A set of working standard solutions was produced by diluting aliquots of the stock solutions to give the desired concentrations of the analytes. For the method linearity assessment, the concentration range was 5.0 to 30.0  $\mu$ g/mL (the concentrations were determined using the calibration graphs. The standard solutions were stable for at least 3 days at 4°C).

### 2.5. Extraction of Soft-Gel Capsules Formulations

Isotretinoin capsules were opened carefully using a sharp blade and the content of these capsules was ex-

tracted directly with THF solvent. The solution containing isotretinoin was shaken for 5 min. 1 mL of aliquot for the resulting solution was diluted in acetonitrile to obtain the final solution concentration (20 µg/mL) that was analyzed by HPLC in comparison with the appropriate standard solution.

### 2.6. Quantification of Isotretinoin

A standard curve was constructed by injecting samples containing isotretinoin standard at concentrations ranging from 3.0 to 30.0 µg/mL. The peak area was determined and plotted versus the concentration of isotretinoin. For the recovery studies, known volumes of isotretinoin standard solutions were analyzed, and the absolute recovery was calculated by comparing the peak area obtained from isotretinoin in the commercial capsule with the peak area of samples derived from the standard solutions.

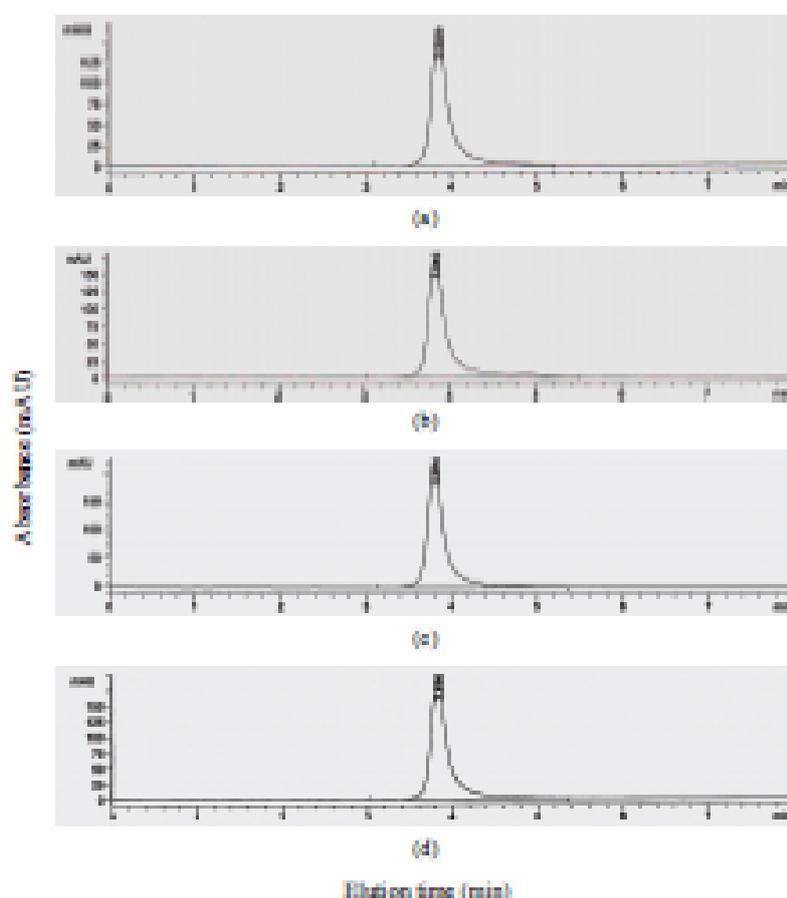
## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The objective of this work was to develop a rapid me-

thod using an isocratic high performance liquid chromatography (HPLC) system to determine quantitatively the isotretinoin in hard gelatin capsule formulations. In order to validate an efficient method for analysis of drugs in pharmaceutical formulations, preliminary tests were performed with the objective to select adequate and optimum conditions. Parameters such as detection wavelength, ideal mobile phase and their proportions, concentration of the standard solutions, and flow rate were exhaustively tested and the quantitative determination of isotretinoin in the gel capsules was made possible under the ideal conditions described in this paper. The proposed method is simple and do not involve laborious time-consuming sample preparation.

### 3.1. Chromatography

The conditions for a rapid and simple HPLC separation with UV detection were developed using an isocratic elution with a mobile phase composed of 0.01% trifluoroacetic acid and acetonitrile (15/85, v/v). These conditions gave well resolved sharp peaks (Figure 1) for



**Figure 1.** Chromatogram of samples. (a) isotretinoin standard (20 µg/mL); (b) Product A (20 µg/mL); (c) Product B (20 µg/mL); (d) Product C (20 µg/mL). Conditions: Lichrospher RP18 column (5 µm, 125 × 4 mm i.d., Merck), mobile phase 0.01% TFA /acetonitrile (15/85, v/v), flow rate 1.0 mL/min, UV detection at 342 nm and ambient temperature (24 ± 2°C).

the isotretinoin commercial formulations but also for the isotretinoin standards. The retention time was of approximately 3.8 min. The shorter elution time makes the method especially useful for routine analysis of isotretinoin in pharmaceutical formulations. The validation experiments as described in the following section were completed to determine if the method could achieve the reproducibility and accuracy required for analysis of formulations.

### 3.2. Method Validation

#### 3.2.1. Method Validation

The quantification of the chromatogram was performed using the peak area of isotretinoin standards for known content of isotretinoin and as references for the determination of the content for the commercial samples to which we determined the peak areas of their respective chromatograms. Five standard solutions ranging from 5.0 to 30.0  $\mu\text{g/mL}$  in concentration (three replicates each), were injected into the HPLC system. The calibration graph was obtained by plotting the peak areas of the standard solutions against the theoretical standard concentrations. The linearity was evaluated by linear least-squares regression analysis. The correlation coefficient obtain with linear regression of curve was 0.997. Statistical analysis indicated excellent linearity as shown in **Table 1**.

#### 3.2.2. Accuracy

To evaluate the accuracy of the proposed method, recovery tests were carried out with all samples. The measurements were performed by adding known amounts of standard solutions to sample followed by analysis using the proposed method. The recovery values obtained were 101.2, 99.4 and 99.3% (why don't you have 100%) for the three soft gelatin capsule formulations, confirming the accuracy of the proposed method. The percentage of recovery results are presented in **Table 1**.

#### 3.2.3. Precision

The precision of proposed method was evaluated through intra-day repeatability of responses after replicate ( $n = 10$ ) injection of sample solutions (20.0  $\mu\text{g/mL}$ ). The precision is expressed as the relative standard deviation (RSD) amongst responses. The standard deviation amongst replicate responses and relative standard deviation values (RSD) were less than 1.0%, indicating precision of the method. The statistical data results obtained

in the analysis of commercially available samples are shown in **Table 2**.

According to the results obtained only one formulation (Product A (branded named)), was found to be good agreement with the claimed content of the drugs. Indeed, the average percentage of isotretinoin content (**Table 3**) for the Product A was evaluated to  $105 \pm 0.05\%$  which fits with United States Pharmacopeia (USP) specifications. In contrast, the content for the generic products formulations Products (Product B and Product C), fall outside the United States Pharmacopeia (USP) specifications. The content percentage of isotretinoin was found to be  $128.5 \pm 0.08$  and  $115.5 \pm 0.04$  in Product B and Product C, respectively. The USP XXX [8] monograph for isotretinoin capsules states that the capsules must contain not less than 90.0% and not more than 110% of the labeled amounts of isotretinoin. The results and the accuracy of the method shows that it is necessary to control the content of the active biomolecule for drug safety, but also that the precision of the method and rapid acquisition of the data can be a plus for pharmaceutical industries for the quality control of their products.

**Table 1.** Statistical results of linear regression analysis in the determination of isotretinoin by proposed method.

Statistical parameters	Results
Intercept of curve (b)	-328.09
Slope of curve (a)	138.86
Linear correlation coefficient (r)	0.997

**Table 2.** Recovery data of standard solutions added to the samples analyzed by using the proposed HPLC method.

Sample	Amount added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amount found* ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery(%)	Mean recovery(%)
Product A	25.0	25.0	100.0	101.2
	30.0	31.3	103.0	
	35.0	36.1	100.6	
Product B	25.0	30.6	98.0	99.4
	30.0	35.8	101.0	
	35.0	40.6	99.3	
Product C	25.0	28.2	102.0	99.3
	30.0	32.9	98.0	
	35.0	37.8	98.0	

\*Average of three determination

**Table 3.** Statistical data obtained in the analysis of samples using the proposed method.

Sample	Declared theoretical concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Found experimental concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Content (%)	RSD (*) (%)	Content (%) Confidence interval (**)
Product A	20.0	21.0	105.0	0.43	$105.0 \pm 0.05$
Product B	20.0	25.7	128.5	0.70	$128.5 \pm 0.08$
Product C	20.0	23.1	115.5	0.30	$115.5 \pm 0.04$

(\*) Average of ten determination (\*\*) 95.0% confidence level.

#### 4. CONCLUSIONS

The proposed HPLC methods for quantitative determination showed good linearity, precision and accuracy for sensitive and selective quantitative determination of isotretinoin in pharmaceutical formulations. This method is not time-consuming and is easy to perform in any laboratory. We ultimately show, according the United States Pharmacopoeia specifications that the average amount of isotretinoin in 2 of the 3 commercial products ranged outside the 90-110%. Safe use of isotretinoin, particularly with respect to teratogenicity, remains a central issue for therapeutics development. Therefore, it is important, that future research determines a comparative study with pharmaceutical quality of isotretinoin products on patient exposure to isotretinoin by comparative bioequivalence tests.

#### 5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the CNPq (National Council of Technological and Scientific Development) CAPES (Foundation to Higher Level People Improvement) and FAPESP (Research Support Foundation in the State of São Paulo) for the financial support.

#### REFERENCES

- [1] Gatti, R., Gioia, M.G. and Covrini, V. (2000) Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by fluorescence. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**(1), 147-159.
- [2] Taylor, P.W. and Keenan, M.H.J. (2006) Pharmaceutical quality of generic isotretinoin products, compared with Roaccutane. *Current Medical Research and Opinion*, **22**(5), 603-615.
- [3] Iozzi, G., Ciome, E., Risoli, A., Genchi G and Fagnio, G. (2005) Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposomes formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, **60**(1-2), 251-260.
- [4] Wetzlich, U. and Mutschler, E. (1995) Quality of cefotaxime sodium preparations. *Arzneimittel-Forschung Drug Research*, **45**(1), 74-80.
- [5] Lambert, P.A. and Conway, B.R. (2003) Pharmaceutical quality of ceftriaxone generic products compared with Rocephin. *Journal Chemotherapy*, **15**(4), 357-368.
- [6] Lammer, E.J., Chen, D.T., Hoar, R.M., Agnish, N.D., Benke, P.J. and Braun, J.T. (1985) Retinoic acid embryopathy. *New England Journal of Medicine*, **313**(14), 837-841.
- [7] Willhite, C.C., Wier, P.J. and Berry, D.L. (1989) Dose response and structure-activity considerations in retinoid-induced dysmorphicogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, **20**(2), 689-695.
- [8] (2007) United States pharmacopoeia. XXIX, *Pharmacopoeia Conventions*, Maryland, 2428-2429.
- [9] Lima, E.M., Diriz, D.G. and Antoniosi-Filho, N.R. (2005) Development of a gas chromatography method for the determination of isotretinoin and its degradation products in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical of Biomedical Analysis*, **38**(4), 678-685.
- [10] Tashroosh, M.B., Jacobson, E.L. and Jacobson, M.K. (2007) A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**(2), 859-864.
- [11] Tan, X., Meltzer, N. and Lindenbaum, S. (1992) Solid-state stability studies of 13-*cis*-retinoic acid and all-trans-retinoic acid using microcolorimetry and HPLC analysis. *Pharmaceutical Research*, **9**(9), 1203-1208.
- [12] Allwood, M.C. and Plane, J.H. (1984) The degradation of vitamin A exposed to ultraviolet radiation. *International Journal of Pharmaceutics*, **18**(2), 207-213.
- [13] Crank, G. and Pardijanto, M.S. (1995) Photooxidations and photosensitized oxidations of vitamin A and its palmitate ester. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **85**(1-2), 93-100.
- [14] Bempong, D.K., Honigberg, I.L. and Meltzer, N.M. (1993) Separation of 13-*cis* and all-trans retinoic acid and their photodegradable products using capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography (MEC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **11**(9), 829-833.