

---

*Resumo*

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

Aline Vivian Vatti Auada, Ivo Lebrun (Orientador)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2011.

---

### 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 criptéínas, 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 utilizou-se 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 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 possivelmente gerem 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 por meio de suas ações nas proteínas (substratos) que estão altamente disponíveis no local da picada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Veneno de serpente. *Bothrops*. Peptídeos. Peptídeos/classificação. Serinas proteases.

---

*Resume*

## ***Obtention of bioactive peptides (cryptides) by the action of trypsin and serine proteases from the venom of *Bothrops jararaca* on endogenous substrates***

**Aline Vivian Vatti Auada, Ivo Lebrun (Orientador)**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2011.

---

### **RESUME**

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 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.

**KEYWORDS:** Snake venom. *Bothrops*. Peptides. Peptides/classification. Serine proteases.