



## Purificação e avaliação da interferência de BthMP (uma metaloprotease da peçonha de *Bothrops moojeni*) na coagulação sanguínea

### Purification and evaluation of the interference of BthMP (a metalloprotease from *Bothrops moojeni*) in blood clotting

Manuela Andrade Santos<sup>1</sup>, Luzia Aparecida Pando<sup>1</sup>, Veridiana de Melo Rodrigues<sup>2</sup>, Mariana de Souza Castro<sup>3</sup>, Mário Sérgio Rocha Gomes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; <sup>2</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia; <sup>3</sup> Laboratório de Toxinologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília

#### ABSTRACT

In the present work reported the purification of the metalloprotease *BthMP*, from the venom of *Bothrops moojeni*. For purification of the protease was used ion exchange chromatography (DEAE-Sepharose) and molecular exclusion (Sephadex G-75), the product of these processes was a protein band with high purity, visualized on SDS-PAGE 14%, referred the *BthMP*. This protease when analyzed on MALDI-TOF revealed the molecular weight of the native form of 23.050 Da and 23.872 Da in the reduced form, and from the peptide fragments obtained by Peptide Mass Fingerprinting (PMF) in MS (MALDI-TOF/TOF) was observed high similarity with *BmooMP $\alpha$ -I* metalloprotease. In enzymatic terms, *BthMP* showed proteolytic activity on azocasein using PMSF and benzamidine, while this activity was inhibited in the presence of EDTA; 1,10-Phenanthroline and  $\beta$ -mercaptoethanol, it is therefore a zinc-dependent metalloprotease of the class P-I. To still with this purpose, we contemplate its enzymatic specificity of the  $\alpha$ A and  $\beta$ B chains of fibrinogen and also the consumption of fibrinogen *in vivo*. It was also found its action on the components of the coagulation cascade, due to prolongation of prothrombin time and partial thromboplastin time. Thus, the sharp fibrinogenolytic activity and the high consumption of fibrinogen *in vivo* are results that indicate the anticoagulant action of *BthMP*; furthermore, their ability to interfere with the coagulation cascade suggested that this protease is promising for future studies that might indicate a new antithrombotic agent model.

#### KEYWORDS

Coagulation cascade, Metalloproteinase, Venom snake

#### RESUMO

Neste trabalho relatamos a purificação da metaloprotease *BthMP*, proveniente da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. Para a purificação desta protease, utilizaram-se os passos cromatográficos de troca iônica (DEAE-Sepharose) e de exclusão molecular (Sephadex G-75), sendo o produto desses processos uma banda proteica com elevado grau de pureza, visualizada em SDS-PAGE a 14%, denominada *BthMP*. Esta, por sua vez, quando analisada em MALDI-TOF revelou a massa molecular nativa de 23.050 Da e 23.872 Da na forma reduzida, e a partir dos fragmentos peptídicos obtidos por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) em MS (MALDI-TOF/TOF) indicou alta similaridade com a metaloprotease *BmooMP $\alpha$ -I*. Em termos enzimáticos, *BthMP* mostrou atividade proteolítica sobre azocaseína e frente ao PMSF e benzamidina, enquanto que esta atividade foi inibida na presença de EDTA, 1,10-fenantrolina e  $\beta$ -mercaptoetanol, sendo portanto uma metaloprotease zinco dependente da classe P-I. Ainda com este propósito, verificou-se sua especificidade enzimática sobre as cadeias  $\alpha$ A e  $\beta$ B do fibrinogênio, e também o consumo de fibrinogênio *in vivo*. Foi constatado ainda sua ação em componentes da cascata de coagulação, devido ao prolongamento do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa). Desta forma, a acentuada atividade fibrinogenolítica e o alto consumo de fibrinogênio *in vivo* são resultados que indicam a ação anticoagulante da *BthMP*; além do mais, sua capacidade de interferir na cascata de coagulação sugere que esta protease é promissora para futuros estudos que possam indicar um novo modelo de fármaco antitrombótico.

#### PALAVRAS-CHAVE

Cascata de coagulação, Metaloprotease, Peçonha de serpente

#### AUTOR CORRESPONDENTE

Mário Sérgio Rocha Gomes <mrochauesb@yahoo.com.br>  
Departamento de Química e Exatas - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Rua José Moreira Sobrinho s/n, Jequiezinho -- CEP: 45028-091  
Jequié - BA

## INTRODUÇÃO

As peçonhas das serpentes são produzidas em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas. As peçonhas, portanto, constituem verdadeiros arsenais bioquímicos com potencial capaz de atrair, paralisar e matar outros organismos. Elas podem apresentar várias funções, como: ataque, captura, digestão de alimentos, ou contribuir para a defesa do animal contra predadores ou agressores.

Cerca de 90% do peso seco da peçonha de serpentes são constituídos por proteínas e enzimas como *fosfolipases A<sub>2</sub>*, *hialuronidases*, *L-aminoácido-oxidases*, *metaloproteases* e *serinoproteases*. Os demais componentes são inibidores enzimáticos, peptídeos e polipeptídios não enzimáticos, compostos orgânicos de baixa massa molecular (RAMOS; SELISTRE-de-ARAUJO, 2006; MATSUI et al., 2000). Esta vasta composição, associado à ampla ação fisiológica tem despertado a curiosidade dos pesquisadores, em uma tentativa de compreender a sua ação fisiopatológica relacionada ao envenenamento ofídico. Muitas vezes o estudo das características destas enzimas isoladas viabiliza a utilização das mesmas em aplicações farmacológicas.

A principal ação sistêmica após o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* (Família *Viperidae*) é o desequilíbrio da hemostasia. Toxinas que alteram o sistema hemostático de mamíferos são conhecidas por apresentarem efeitos procoagulantes ou anticoagulantes. As peçonhas botrópicas são, portanto, capazes de ativar fatores da coagulação sanguínea, ocasionando o consumo de fibrinogênio, formação de fibrina e induzindo frequentemente à incoagulabilidade sanguínea. A maioria das serpentes do gênero *Bothrops* apresenta, isolada ou simultaneamente, componentes capazes de ativar o fibrinogênio, a protombina e outros fatores da cascata de coagulação, sobretudo FII, FV e FX (ESCALANTE et al., 2011; SAJEVIC et al., 2011; MATSUI et al., 2000).

Dentre os diversos componentes das peçonhas de serpentes da família *Viperidae*, destacam-se as enzimas proteolíticas: metaloproteases e as serinoproteases. Estas proteases têm sido alvos de estudos e de interesses particulares, pois estão diretamente relacionadas com as diversas patologias do envenenamento como: hemorragia, edema, inflamação, necrose e desordens relacionadas com o processo da hemostasia (SAJEVIC et al., 2011; RAMOS; SELISTRE-de-ARAUJO, 2006).

As metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs - *Snake Venom Metalloproteinases*), são enzimas endopeptidases que compreendem um amplo grupo de proteínas da família zinco dependente “metzincin”, que juntamente com as proteínas ADAMs (proteínas reprodutivas de mamíferos), pertencem à subfamília

“*reprolysins*”, já que elas apresentam uma organização estrutural de domínios semelhantes. Estas enzimas apresentam uma região padrão conservada (HEBXHXBG BXH) ligada a zinco, onde H é uma histidina, E um ácido glutâmico, G uma glicina, B um resíduo hidrofóbico e X qualquer aminoácido (RAMOS; SELISTRE-de-ARAUJO, 2006; SAJEVIC et al., 2011).

Estas proteases com especificidade sobre a cadeia A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio são observadas como modelo molecular de possíveis agentes terapêuticos a ser aplicado no tratamento da trombose e distúrbios relacionados com a coagulação. Principalmente por afetarem cascata de coagulação sanguínea, fibrinólise e função plaquetária (MATSUI et al., 2000; SAJEVIC et al., 2011).

Estimando esta diversidade de proteínas e/ou peptídeos bioativos em peçonha de serpentes e tamanha aplicabilidade, este trabalho teve como foco principal buscar dados complementares ao estudo da enzima proteolítica *BthMP* (*Metaloprotease Bothrops moojeni*) purificada por (GOMES et al., 2009), tanto em termos estruturais quanto ao biológico funcional, pois dados preliminares indicam uma possibilidade de *BthMP* interferir na coagulação sanguínea.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAIS

Neste estudo foi utilizada a peçonha bruta liofilizada da serpente do gênero de *Bothrops moojeni*, obtida a partir de espécies mantidas no Serpenteiro Proteína Bioativas LTDA–Batatais/SP. A peçonha foi estocada a -20°C no laboratório de Bioquímica da UESB. Reagentes: Acrilamida, bis-Acrilamida, Bicarbonato de Amônia, TEMED, EDTA, Azul de Bromofenol, Coomassie Brilliant Blue, Glicina, Fibrinogênio bovino, Persulfato de amônio, Soroalbumina bovina, Tris (Hidroximetilaminometano), Azocaseína; Aprotinina, Benzamidina, 1,10-Fenantrolina, resinas cromatográficas (Sigma Chem. Co. e GE Healthcare). Vale destacar que os demais reagentes usados foram todos de grau analítico.

### ANIMAIS

Os experimentos envolveram camundongos da raça Swiss (Família *Muridae*), com aprovação do comitê de ética em experimentos animais da UESB; n° de protocolo 25/2013.

### FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA

A obtenção da enzima *BthMP* foi realizada utilizando a metodologia descrita por GOMES et al., 2009; com algumas alterações; sendo que cerca de 200 mg de peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi dissolvida em 2 mL de tampão bicarbonato de amônia (AMBIC) 0,05 molar, pH 7,8, e, posteriormente centrifugada numa rotação de

1000xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi aplicado em 50 mL de resina de troca iônica DEAE-Sephrose, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Este passo cromatográfico foi conduzido inicialmente com o tampão AMBIC 0,05 molar e a partir da fração 85, foi estabelecido o gradiente convexo de concentração de 0,05 a 0,50 molar. As frações cromatográficas foram acompanhadas por leitura em espectrofotômetro a 280 nm.

A fração MD2, obtida foi aplicada em uma resina de exclusão molecular Sephadex G-75 e eluída com tampão AMBIC 0,05 molar. Esta etapa cromatográfica foi conduzida com fluxo constante e frações de 3 mL foram coletadas e monitoradas por leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Neste passo cromatográfico obtivemos a protease *BthMP* (Metaloprotease de *Bothrops moojeni*). Cerca de 200µg de *BthMP* foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna µRPC C4 de 4,6x150mm (GE Healthcare Bio-Sciences) e eluída com o solvente (acetonitrila 80%, v/v e ácido trifluoracético 0,1%, v/v). As dosagens de proteínas em soluções foram realizadas utilizando o método estabelecido por Bradford (1976).

#### ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 14% com agente desnaturante (SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por LAEMMLI (1970). As eletroforeses foram realizadas em sistema de eletroforese Vertical GRS 300STD. Após a corrida, os géis foram corados em uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (m/v) em água e metanol na proporção de 1:1 (v/v) e descorados numa solução de ácido acético a 7%.

#### ANÁLISE POR MALDI-TOF MS E IDENTIFICAÇÃO POR BIOINFORMÁTICA

A massa molecular da protease também foi determinada por espectrometria de massas com ionização (MALDI-TOF-MS) (*Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*). As análises foram feitas em espectrofotômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF, modelo AutoFlex III Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A metodologia de espectrometria de massa foi utilizada para a identificação da sequência parcial da protease. Uma amostra da enzima foi digerida com tripsina e o espectro de massa foi analisado com o *software Biotoools* (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína foi realizada com o *software Mascot*. Posteriormente, foi realizada pesquisa no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando para análise da sequência o programa de bioinformática BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE O FIBRINOGÊNIO

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino foi

realizada conforme o descrito por (GOMES et al., 2009), com modificações. Amostras contendo 50 µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5mg/mL) em Tris-HCl 50 mM, pH=7,4 foram pré-incubadas com 5µg da protease a 37°C em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 30 e 60 min.). Interrompeu-se a reação com a adição de 50 % (v/v) da solução tampão (*stop*) contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH=6,5; SDS 2% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Em seguida, a mistura foi aquecida a 100°C por 5 min. e o produto da reação analisado em SDS-PAGE a 14%, conforme descrito anteriormente.

#### ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE A AZOCASEÍNA

Para a realização da atividade azocaseinolítica, foi utilizado o substrato sulfanilamida-azocaseína (*Sigma-Aldrich*). Amostra contendo 5,0 µg de *BthMP* foi incubada com 800 µL da solução de azocaseína (1,5 mg/mL) em Tris-HCl 20 mM, pH=7,4, contendo CaCl<sub>2</sub> 5 mM por 30 min. a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloro acético a 10% (v/v). A mistura permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 20 min. e posteriormente foi centrifugada por 15 min. a 4.000xg. Uma unidade (U) de atividade azocaseinolítica foi definida como sendo o acréscimo de 0,001 unidades de absorbância a 405 nm. O efeito dos inibidores de proteases também foi testado utilizando a atividade azocaseinolítica como parâmetro. Para este ensaio, utilizou-se 5,0 µg de *BthMP*, a qual foi pré-incubada por 30 min. à 37°C com 10µL de soluções de EDTA 10mM, 1,10-fenantrolina 10 mM, benzamidina 10 mM, PMSF 10 mM e β-mercaptoetanol 10 mM. Posteriormente ao período de incubação, a atividade proteolítica foi realizada conforme descrito anteriormente.

#### DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COAGULAÇÃO (TP e TTPa)

Para determinar a capacidade de *BthMP* em interferir nos parâmetros da coagulação sanguínea (TP, TTPa), em grupos de 3 animais (*Swiss*, 20-25g.) foram injetados com 10 µg/50µL de *BthMP* em solução salina 0,9 % por via intraperitoneal (i.p.). Os animais controle receberam somente 50 µL de salina. Após 3 horas de inoculação os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado por 360xg durante 15 min. a 4°C, e o plasma obtido foi utilizado para determinar o TP, TTPa, com base na metodologia descrita no kit comercial “HemoStat Kit”. Os testes foram realizados em triplicata.

#### QUANTIFICAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO PLASMÁTICO

Para quantificar o fibrinogênio plasmático, 10 µg da peçonha de *Bothrops moojeni* e de *BthMP* foram dissolvidos em 50 µL de solução salina 0,9% e inoculado por via intraperitoneal (i.p.) em grupos de 3 animais (*Swiss*, 20-25g). Os animais controle receberam somente 50 µL de

Salina. Após 3 horas de inoculação os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado por 360xg durante 15 min., a 4°C, e o plasma obtido foi utilizado para determinar a quantidade de fibrinogênio plasmático, conforme metodologia descrita no kit comercial “HemoStat Kit”. Os testes foram realizados em triplicata.

#### ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

A montagem dos gráficos, os cálculos das médias e os desvios padrões das médias foram realizados com auxílio do software Prisma 5.0.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Distúrbios de coagulação sanguínea são uma das consequências produzidas pelo envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. As metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs) desempenham um relevante papel na patogênese do envenenamento cujas principais efeitos são a ruptura do sistema hemostático com ação direta sobre o fibrinogênio, fibrina, fator da coagulação e interferindo na agregação plaquetária. Contudo, este trabalho teve como objetivo a obtenção da enzima proteolítica *BthMP* e avaliar a sua ação sobre a coagulação sanguínea.

Desta forma, inicialmente a peçonha da serpente de *Bothrops moojeni* foi diluída em tampão AMBIC, centrifugado e o sobrenadante proteico foi aplicado em resina DEAE-Sepharose previamente equilibrada com o mesmo tampão e acompanhado de um posterior gradiente convexo de concentração de 0,05-0,50 molar do tampão AMBIC; gradiente este estabelecido a partir da fração 85. As medidas de absorvância obtidas traçaram o perfil das frações e revelaram picos cromatográficos bem definidos, o que possibilitou delimitar e reunir as frações em *pools*, sendo-as liofilizadas em seguida os picos selecionados foram denominados de MD1, MD2, MD2a, MD3, MD4, MD5, MD6 e MD7 (Figura 1A).

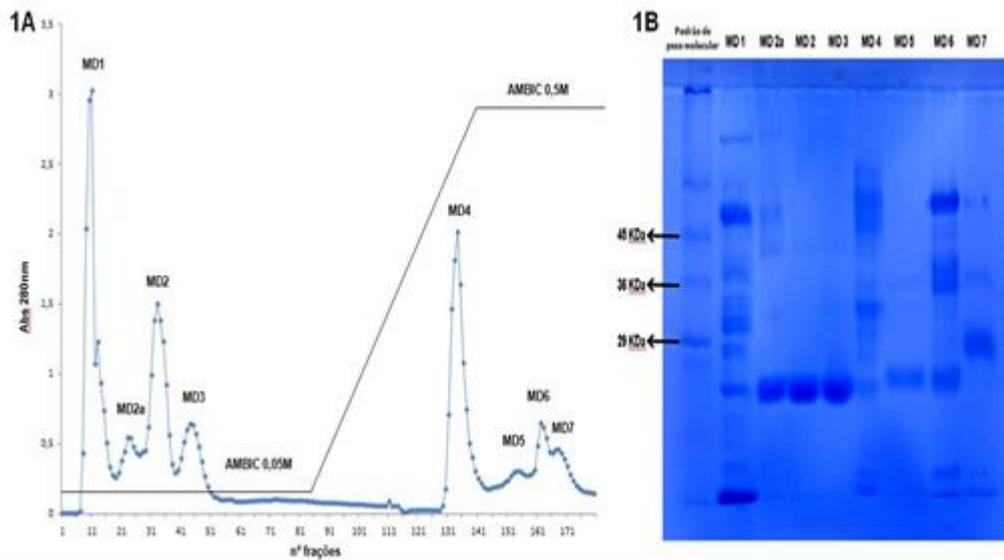
Em associação a esta cromatografia, visualizou-se os picos MD's em SDS-PAGE a 14% em condições desnaturadas. Para isto, destaca-se o perfil eletroforético do MD2 que apresentou perfil proteico com bom grau de pureza em gel de eletroforese (Figura 1B).

O próximo procedimento cromatográfico se encarregou de seguir a metodologia descrita por (GOMES et al., 2009), sendo que a fração MD2 após ser liofilizada foi aplicada em cromatografia de exclusão molecular, usando a resina Sephadex-G-75 (Figura 2A). Onde se obtiveram três picos cromatográficos, dos quais foram selecionadas as frações do segundo pico, o qual apresentou elevado grau de pureza observado em SDS-PAGE a 14 % e esta foi identificada por *BthMP* (Figura 2B).

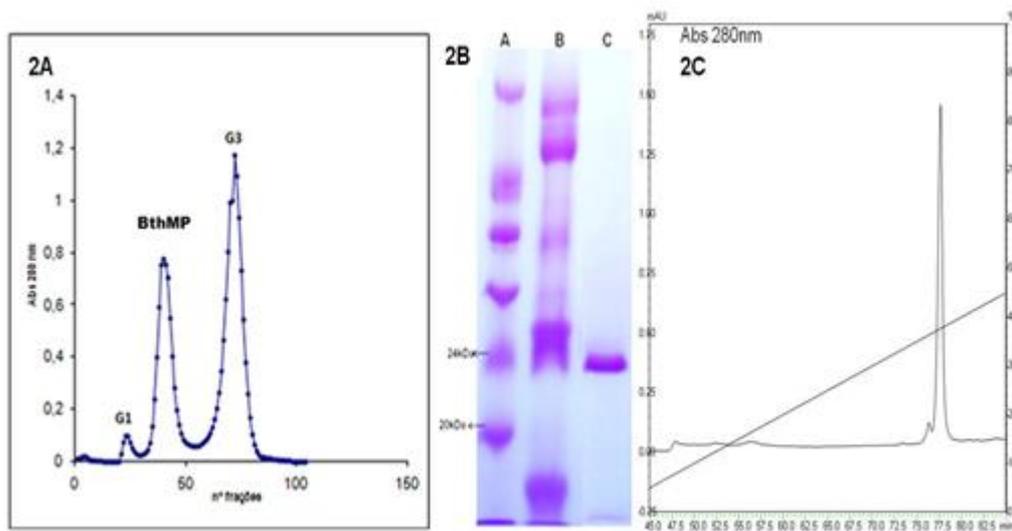
Estando a *BthMP* purificada e quantificada, foram feitas posteriores caracterizações as quais buscaram confirmar e enriquecer os dados já publicados, através do estudo mais aprofundado da estrutura desta protease, bem como avaliar a sua interferência na coagulação sanguínea. Parte da análise estrutural da *BthMP* foi realizada em um Espectrômetro de Massas de Ionização e Dessorção de Matriz Assistida por Laser (MALDI-TOF-MS). Diante da resposta rápida, precisa e sensível que este tipo de técnica fornece nas medidas das macromoléculas (MAZUMDAR; BANERJEE, 2012), este processo de detecção necessariamente requer uma amostra com elevado grau de pureza, por isso, uma pequena porção de *BthMP* foi aplicada em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) o qual revelou um alto grau de pureza da amostra (Figura 2C).

Assim, utilizando a amostra proveniente da fase reversa, realizou-se a determinação da massa molecular de *BthMP* por MALDI TOF, sendo de 23,050 kDa a forma nativa e quando reduzida, revelou massa molecular de 23,872 kDa (Figura 3). Esta massa molecular condiz com o já estimado anteriormente em SDS-PAGE 14%, que foi em torno de 23 kDa (GOMES et al., 2011), porém em um nível maior de precisão devido a sensibilidade da técnica utilizada. A forma reduzida desta proteína foi obtida através do uso de agente redutor, o qual tem a característica de romper ligações dissulfeto da estrutura terciária da proteína. Logo, a diferenciação entre a massa reduzida e nativa indica que, em sua composição estrutural, *BthMP* possui um valor considerável de pontes dissulfeto, as quais são estabelecidas por resíduos de aminoácidos de cisteína. A este respeito, os investigadores Foxe Serrano (2010), expõem que especificamente as metaloproteases (SVMPs) são caracterizadas por possuírem diversas pontes dissulfeto. Estes mesmo autores verificaram por meio das análises de estruturas cristalizadas de SVMPs P-I, que estas proteases possuem de duas a três pontes dissulfeto, as quais contribuem na estrutura tridimensional e consequentemente em sua atividade biológica; entretanto a quantidade de pontes de sulfeto é ainda maior em SVMPs das classes P-II e P-III devido à presença dos domínios adicionais (RAMOS; SELISTRE-de-ARAÚJO, 2006; SAJEVIC et al., 2011).

Como exemplos de proteínas extraídas da peçonha de serpentes com peso molecular próximo ao da *BthMP*, incluem-se a *BJ-P12* de *B. jararaca* com 23,080 kDa (SILVA et al., 2012), *Batoraxase* de *B. atrox* com 22,900 kDa (CINTRA et al., 2012), *BleucMP* de *B. leucurus* com 23,060 kDa (GOMES et al., 2011), todas determinadas por MALDI-TOF-MS. Neste contexto, destaca-se a similaridade do peso molecular entre *BthMP* e outras SVMPs da classe P-I, confirmando assim tratar-se de uma



**Figura 1.** (1A) Representação gráfica da cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose com peçonha da serpente *Bothrops moojeni* e, representação do gradiente convexo de concentração que foi estabelecido a partir da fração 85 de 0,05-0,50 M de AMBIC pH 7,8. (1B) SDS-PAGE (14%) mostrando o perfil eletroforético de frações cromatográficas (reunidas em *pools*) da peçonha de serpente *Bothrops moojeni* em resina DEAE-Sepharose com um gradiente convexo de concentração 0,05-0,50 M do tampão AMBIC pH 7,8.

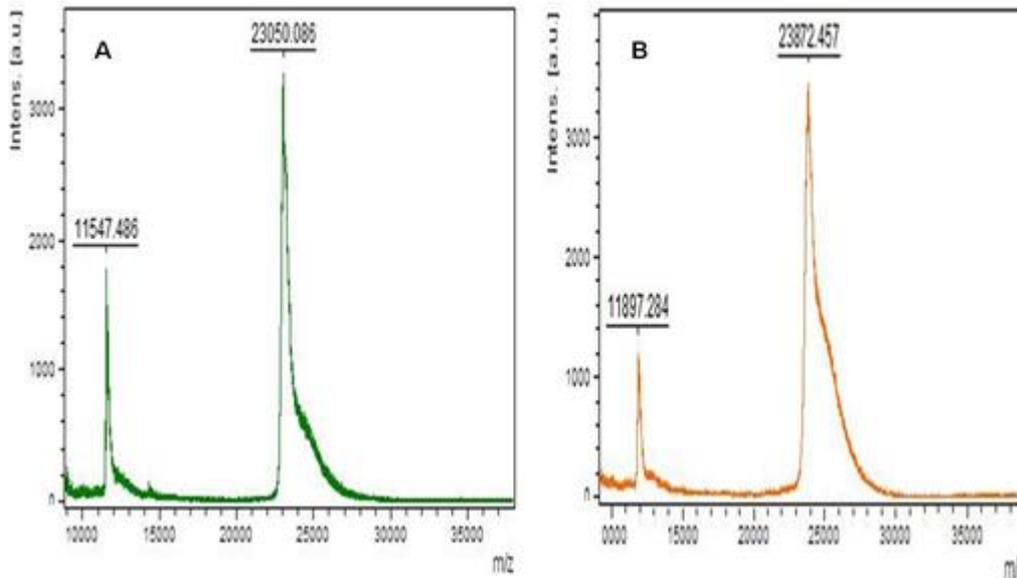


**Figura 2.** (2A) Cromatografia de exclusão molecular de MD2 usando resina Sephadex G-75 com eluição num fluxo de 18 mL/h do tampão AMBIC 0,05M de pH 7,8. (2B) SDS-PAGE (14%): (A) marcador de peso molecular, (B) 10 µg da peçonha bruta de serpente *B. moojeni* e (C) 10 µg de *BthMP* reduzida com  $\beta$ -mercaptoetanol. (2C) Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência de *BthMP*, realizada com uma coluna do tipo  $\mu$ RPC C4 de 4,6x150mm (*GE Healthcare Bio-Sciences*).

de uma metaloprotease da classe P-I.

Também foi determinada uma sequência peptídica desta proteína, para isto *BthMP* foi digerida em solução de tripsina (endopeptidase que fragmenta a proteína em pequenos peptídeos/polipeptídeos) e submetida ao espectrômetro de massa, de onde se obteve o espectro dos fragmentos peptídicos (Figura 4A). Este espectro foi

analisado utilizando a técnica de bioinformática em MALDI TOF, com o programa Mascot Search Results (*Matrix Science*), o qual revelou score significativo (score de 80 e  $p < 0.05$ ) com a metaloprotease não hemorrágica *BmooMPa-I*, proveniente também da peçonha da serpente do gênero *Bothrops moojeni* (BERNADES et al., 2008). Posteriormente, selecionou-se o peptídeo de massa



**Figura 3.** Massas moleculares de *BthMP* determinada em MALDI TOF-MS na forma (A) nativa e (B) reduzida.

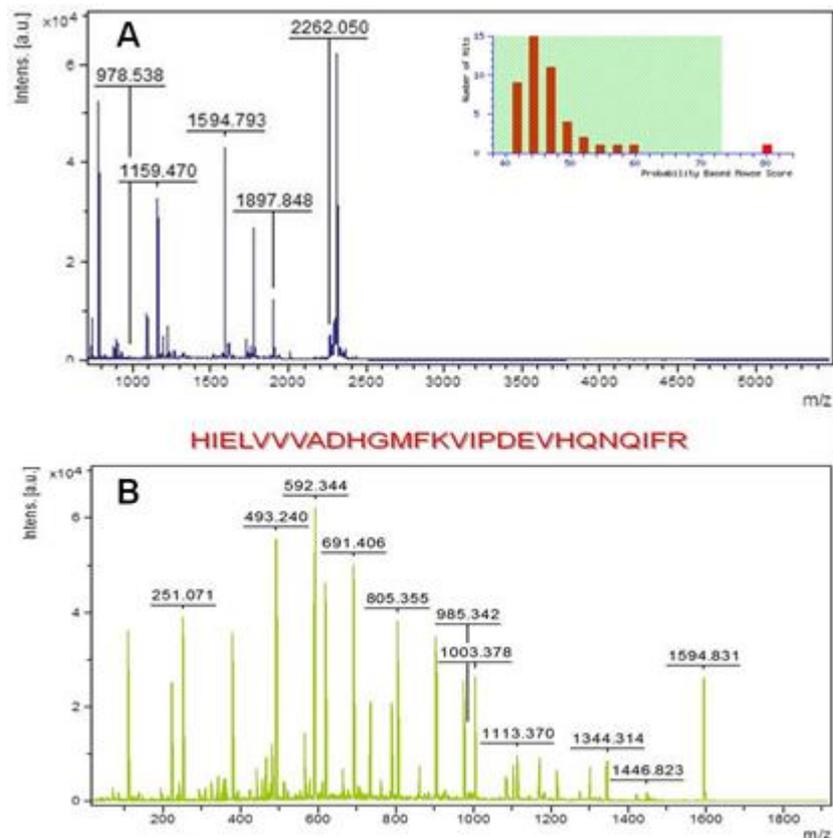
1594.793 Da, e, no mesmo aparelho de MALDI TOF, foi aplicada a técnica do tipo duplo TOF, através de análise peptídica conhecida como *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). Com esta metodologia foi possível determinar a sequência do peptídeo 1594.793 Da proveniente a digestão da protease *BthMP* (Figura 4B).

Além de *BmooMPa-I* de *Bothrops moojeni*, a sequência peptídica obtida pela análise do peptídeo 1594.793Da proveniente de *BthMP* apresentou alta homologia com outras metaloproteases da classe P-I (Figura 5), tais como *Atrolysin – E* de *Crotalus atrox* (SANCHEZ et al., 2010) e *BaPI* de *Bothrops asper* (WATANABE et al., 2003). Desta maneira, pode-se afirmar, de acordo com a classificação das metaloproteases apresentadas por FOX; SERRANO, (2010), que *BthMP* é uma metaloprotease da classe P-I.

Em sua estrutura, as metaloproteases de peçonha de serpentes possuem no seu sítio catalítico um metal ligante ( $Zn^{+2}$ ), este por sua vez é o responsável pela atividade enzimática destas proteases (RAMOS; SELISTRE-de-ARAÚJO, 2006). Por isso, na intenção de testificar o comportamento enzimático da *BthMP*, esta proteína foi submetida a pré-incubação com o substrato azocaseína e, como resultado pode-se observar que *BthMP* apresentou alta atividade proteolítica (resultados não mostrados). Entretanto, quando pré-incubada com EDTA e 1,10-fenantrolina e posteriormente realizado o ensaio sobre a azocaseína, notou-se que a atividade proteolítica da *BthMP* foi afetada, devido a eficiência destes complexantes metálicos em formar quelatos estáveis com o íon zinco ( $Zn^{2+}$ ). No entanto, na presença dos reagentes PMSF

(fluoreto de fenilmetilsulfonila) e benzamidina, averiguou-se que a atividade proteolítica desta protease não foi inibida, isto porque os mesmos são inibidores de serinoproteases e não de metaloproteases, logo, mais uma vez, pode-se afirmar que *BthMP* é uma metaloprotease, especificamente zinco dependente. Neste contexto, também chamou atenção a alta inibição proteolítica da *BthMP* frente ao  $\beta$ -mercaptoetanol, mostrando desta maneira, que as pontes dissulfeto são componentes essenciais na manutenção da estrutura tridimensional da protease e por consequência na sua atividade proteolítica.

Com relação aos alvos enzimáticos das *SVMPs*, são reportadas variabilidades entre as classes das metaloproteases. Por exemplo, *SVMPs* das classes P-II e P-III normalmente induzem hemorragia, e da classe P-I, não são hemorrágicas ou induzem muito pouca hemorragia; esta disparidade se deve basicamente à presença dos domínios externos *dis-like* e *cys-rich* (em P-III) e um tipo desintegrina (em P-II) na estrutura tridimensional destas metaloproteases, os quais facilmente se ligam aos componentes da membrana basal (BM) e a células endoteliais, danificando assim os vasos capilares, sem contar que estes domínios externos também se ligam a integrinas de plaquetas, ajudando desta forma para que não ocorra agregação plaquetária e, conseqüentemente contribuindo para o maior potencial hemorrágico (ESCALANTE et al., 2011; SAJEVIC et al., 2011). Enquanto isso, as metaloproteases P-I, apesar da pouca ou nenhuma atividade hemorrágica, têm revelado alta atividade proteolítica sobre os componentes da cascata de coagulação sanguínea, especialmente sobre o fibrinogênio



**Figura 4.** (A) Perfil do espectro de massas dos fragmentos obtidos pela digestão da SVMP *BthMP*. Os espectros de massa foram analisados com o software Mascot Search; score significativo ( $p < 0.05$ ). (B) Perfil do espectro gerado pela análise do peptídeo 1594.793 Da em MALDI TOF utilizando a técnica de Peptide Mass Fingerprinting (PMF).

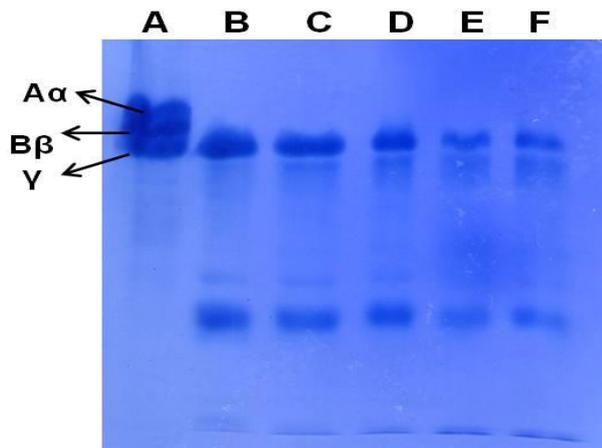


**Figura 5.** Alinhamento da sequência peptídica proveniente do pico 1594,83 Da obtida por PMF com SVMPs da classe P-I: *Bothrops moojeni* (*BmooMPalfa-I*); *Crotalus atrox* (*Atrolysin – E*), *Bothrops asper* (*BAPI*). Para análise sequencial foi utilizado o programa de bioinformática BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

(Fator I). Muitas das SVMPs da classe P-I apresentam este caráter, das quais temos *BJ-P12* de *B. jararaca* (SILVA et al., 2012); *Batroxase* de *B. atrox* (CINTRA et al., 2012); *BleucMP* de *B. leucurus* (GOMES et al., 2011); dentre outras. Estas metaloproteases são chamadas de enzimas fibrinogenolíticas, porque provocam o consumo do fibrinogênio, causando assim uma desfibrin (ogen)ação e, por consequência, tornando o sangue mais fluido e aumentando o tempo de coagulação.

As enzimas fibrinogenolíticas degradam as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio, com maior preferência pela cadeia A $\alpha$  e dificilmente alcançam a cadeia  $\gamma$  (SAJEVIC et al.,

2011). Diante disto, a atividade fibrinogenolítica da *BthMP* foi verificada através da incubação de fibrinogênio bovino com *BthMP* (Figura 6), onde foi possível observar que em apenas 5 minutos esta protease degradou completamente a cadeia A $\alpha$  e parcialmente a cadeia B $\beta$  do fibrinogênio. E, com 10 minutos de incubação, a cadeia B $\beta$  se mostrou praticamente hidrolisada pela ação proteolítica desta enzima. Sendo assim, pode-se designar *BthMP* como uma metaloprotease fortemente fibrinogenolítica, pertencendo desta forma à classe das  $\alpha$ -fibrinogenases e confirmando os dados de Gomes e outros (2009), para a purificação da referida enzima.



**Figura 6.** Perfil da digestão do fibrinogênio bovino em eletroforese de poliacrilamida (PAGE-SDS a 14%). Para este ensaio foram utilizados 50  $\mu$ L de solução de fibrinogênio bovino 1,5 mg/mL incubados com 5  $\mu$ g de *BthMP* a 37°C em diferentes intervalos de tempos. A – Fibrinogênio controle. B-F: Fibrinogênio incubado com 4  $\mu$ g de *BthMP* por 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, respectivamente.

No sistema circulatório humano, o fibrinogênio (fator I da cascata de coagulação) é uma proteína circulante do sangue que participa do complexo sistema de coagulação sanguínea. Sua principal atividade resulta na formação do coágulo de fibrina e se inicia a partir da ação da trombina (fator II), por meio de ativações em séries com os demais componentes participantes da cascata de coagulação (SAJEVIC et al., 2011).

Diante disto, percebe-se que a degradação do fibrinogênio provocada por *BthMP*, e por consequência o efeito de incoagulabilidade sanguínea, podemos sugerir uma possível aplicação clínico-terapêutica para desordens relacionadas ao sistema hemostático.

Esta característica de interferência na coagulação sanguínea da protease *BthMP* foi verificada inicialmente por GOMES e outros (2009), quando a protease foi injetada intraperitoneal em camundongos machos saudáveis da raça *Swiss*, onde se observou a incoagulabilidade sanguínea nestes animais, devido, segundo estes pesquisadores, à provável capacidade desta metaloprotease em degradar fibrinogênio *in vivo* e de não ser inibida por fatores exógenos. Por isso, ainda com este propósito, contemplamos esta propriedade da *BthMP* através da quantificação de fibrinogênio plasmático, onde verificou-se que esta metaloprotease provocou o consumo do fibrinogênio de maneira significativa (Figura 7A), assim como, quando avaliada *in vitro* (Figura 7B), desta forma, pode-se concluir que *BthMP* é uma enzima fibrinogênolítica

fibrinogênolítica que não sofre a interferência de fatores endógenos.

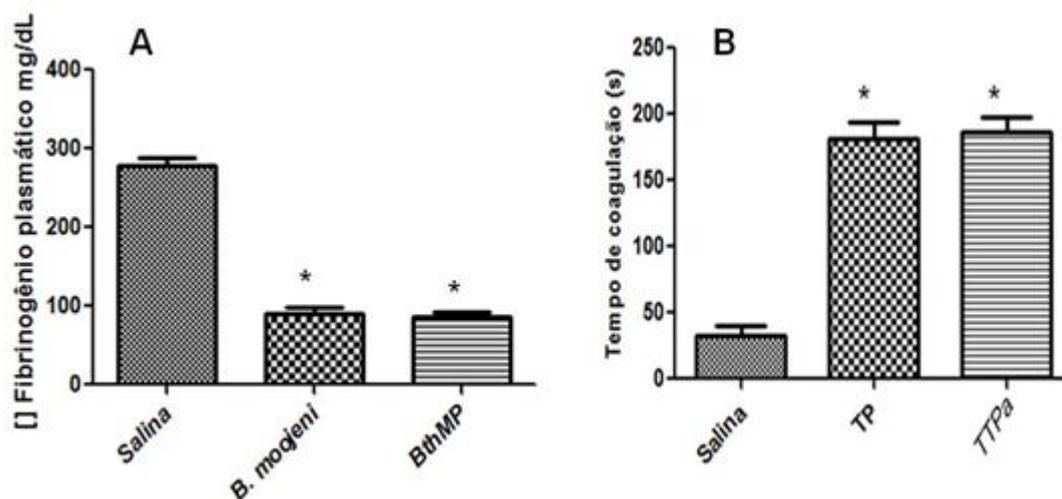
Vale ressaltar que a ação específica de enzimas sobre o fibrinogênio é muito importante, tendo em vista que o fibrinogênio (Fator I) é abundante no plasma e desempenha papel fundamental na hemostasia. Nas reações inflamatórias, tem provável papel no reparo tecidual e na cicatrização, sem contar que a dosagem sanguínea do fibrinogênio permite aos profissionais da área de saúde identificar patologia relacionada à coagulação (FOX; SERRANO, 2010; SAJEVIC et al., 2011).

Assim, atividade anticoagulante, somando-se ao fato de ser fracamente hemorrágica e de não ser inibida por fatores endógenos, são características da *BthMP* que sugerem a capacidade desta metaloprotease ser uma forte candidata a modelo de fármacos antitrombóticos.

Outra forma de analisar o sistema hemostático é através dos testes comumente utilizados na área clínica para diagnosticar distúrbios relacionados à coagulação. Destes, o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) avaliam anormalidades nos fatores da cascata de coagulação sanguínea.

O TP é um teste que avalia a via extrínseca e a via final comum (fatores VII, X, V, II e o fibrinogênio) e o TTPa avalia os fatores da via intrínseca e da via final comum (XII, XI, IX, VII, X, V, II e fibrinogênio) (MATSUI et al., 2000; SAJEVIC et al., 2011). Por isso, foi analisado a interferência da *BthMP* nos tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada (Figura 7B). Observando os valores destes parâmetros frente à *BthMP*, verificou-se uma média de 186 segundos para TTPa e de 182 segundos para TP, respectivamente (Figura 7B), isto informa que o tempo de ambos (TTPa e TP) foram prolongados, desta forma, pode-se sugerir que *BthMP* interfere em fatores da coagulação sanguínea da via extrínseca, intrínseca e também da via final comum, especialmente sobre o fibrinogênio, que neste caso é provavelmente devido a capacidade de consumir fibrinogênio plasmático, conforme testificado nas análises anteriores. Com isso, presume-se que a formação de coágulo de fibrina é comprometida quando *BthMP* se encontra no meio, assim, mais uma vez pode-se inferir que esta metaloprotease é uma protease com ação anticoagulante.

Assim, olhando em sua totalidade, percebe-se neste estudo o potencial da *BthMP* como uma metaloprotease P-I que possui ação sobre o sistema hemostático, especialmente sobre o fibrinogênio (fator I da cascata de coagulação), o que lhe confere a característica de enzima



**Figura 7.** (A): Dosagem do fibrinogênio plasmático utilizando 10 $\mu$ g da peçonha de *Bothrops moojeni* e 10  $\mu$ g de *BthMP* diluído em 50 $\mu$ L de solução salina 0,9%. Como controle foi utilizado 50 $\mu$ L de salina. O resultado representa a média de n=3 e a significância relativa ao controle. (B): Determinação do TP (Tempo de Trombina) e do TTPa (Tempo de Tromboplastina Parcial ativado). Média do tempo de coagulação de salina (controle), do TP e TTPa através da incubação com 10  $\mu$ g de *BthMP* por 3 horas (n=3).

fibrinogenolítica com a provável utilização como modelo molecular de fármaco anticoagulante

Porém, visto que existem diversos fatores estruturais e biológicos funcionais envolvidos neste processo, pode-se afirmar que esta investigação consistiu do aprofundamento e consolidação de alguns resultados, até então não relatados na literatura sobre a *BthMP*, como a confirmação da massa molecular em um nível elevado de precisão e a determinação da sequência peptídica; o que ocasionou também a confirmação desta protease ser uma metaloprotease pertencente a classe P-I, o fato desta não ser inibida por fatores endógenos, a ação sobre o fibrinogênio e sobre as vias extrínseca e intrínseca avaliados em testes laboratoriais específicos para os fatores da cascata de coagulação.

Com isso, percebe-se que este estudo complementa os dados já descritos por GOMES e outros (2009) e pode-se concluir que esta enzima apresenta a capacidade de ser utilizada como modelo para a elaboração de um novo fármaco antitrombótico. Faz-se importante salientar que para tal são necessários testes mais aprimorados para o conhecimento das consequências e ação desta enzima no organismo humano.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores do presente trabalho agradecem a CAPES pela concessão de bolsas de mestrado e ao CNPq, FAPESB e PPG/UESB pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- BERNADES, C. P., et al., Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 574-584, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p. 248-254, 1976.
- CINTRA, A. C. O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v.60, n.1, p. 70-82, 2012.
- ESCALANTE, T., et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, v. 74, n.9, p. 1781-1794, 2011.
- FOX, J. W., SERRANO, S. M. T. Snake venom metalloproteinases. In: MACKESSY S. P, **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. London: Taylor & Francis Group, 2010. Cap. 4, p. 95-113.
- GOMES, M. S. R. et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n.1, p. 24-32, 2009.
- GOMES, M. S. R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (*BleucMP*) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 153, n.3, p. 290-300, 2011.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MATSUI, T. et al. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1477, n.1-2, p. 146-156, 2000.

MAZUMDAR, S., BANERJEE, S. Electrospray Ionization Massa Spectrometry: A Technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 1-41, 2012.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-de-ARAUJO, H. S. Review: Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 142, n. 3-4, p. 328-346, 2006.

SANCHEZ, E. F et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and patelets. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.496, n. 1, p. 9-20, 2010.

SAJEVIC, T. et al. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n.5, p. 627-645, 2011.

SILVA, I. R. F. et al. BJ-P12, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 11, p. 1809-1821, 2012.

WATANABE, L. et al. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Sci.**, v. 12 n. 10, p. 2273-81, 2003.