

# CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE UMA ISOFORMA DE TROMBINA-LIKE DE *BOTHROPS PICTUS* (TSCHUDI, 1845)

Gisele Prado da Rosa <sup>1</sup>

Luis Alberto Ponce Soto <sup>2</sup>

Ronald Navarro Oviedo <sup>3</sup>

Roxana Mestas Valdivia <sup>4</sup>

Milagros Fanny Vera Castro <sup>5</sup>

## Resumo:

A serpente *Bothrops pictus* (Tschudi, 1845) é uma espécie importante já que além de ser endêmica do Perú sua peçonha possui uma atividade eminentemente proteolítica e pro-coagulante, sugerindo a presença de enzimas serinoproteasas, capazes de atuar ao nível da cascata de coagulação sanguínea, especificamente na via fibrinogenolítica (Fator I) estas receberam o nome de Trombina "like". No presente trabalho se caracterizou estrutural e funcionalmente uma isoforma de enzima "semelhante" a trombina a partir do veneno total de *B. pictus* o qual foi fornecido pelo Departamento Acadêmico de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Nacional de Trujillo. Os estudos necessários para caracterização estrutural da proteína, foram realizados no Laboratório de Espectrometria de Massas Thomson, do Instituto de Química UNICAMP na responsabilidade do Prof. Luis A. Ponce Soto Ph.D. Assim mesmo se realizaram duas etapas cromatográficas: cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-50; A trombina "like" foi obtida com um alto grau de homogeneidade molecular e pureza, sem perda de atividade biológica. A determinação da atividade fibrinogenolítica foi medida quantitativamente pelo método descrito por Ware e Seegers (1949). O fibrinogênio bovino 2 mg/mL foi utilizado como substrato para o TL-Bp-2. A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação primeiro sinal de formação da rede de fibrina. Para a degradação do fibrinogênio foi realizado num gel descontínuo de Poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo o método estabelecido por Ware y Seegers (1949) e modificada por Rodrigues et al.,(2000). A TL-Bp-2 sometida a eletroforeses em SDS-PAGE, mostrou uma massa relativa de 31 kDa em condições redutoras e com maior exatidão mediante espectrometria de massa MALDI-TOF com uma massa de 26,297kDa. Para o análise estrutural da sequência foi suficiente a sequência de 5 peptídeos trípticos gerados a partir da fração II-2 da cromatografia de IC em SP-Sephadex C-50, os quais foram sometidos a um análise de homologia sequencial utilizando a base de dados <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>, com o qual se conferiu

que esta serinoproteasa é uma isoforma de TLE-Bp (Vivas et al.2015). A fração de TL-Bp-2 do pico II-2 da cromatografia de troca iônica evidenciou atividade fibrinogenolítica sobre o fibrinogênio bovino comercial (2 mg/mL) hidrolisando a cadeia alfa () e beta () e comportando-se como uma trombina "like" tipo venombina AB.

**Palavras-chave:** TROMBINA,SERINOPROTEASE

**Modalidade de Participação:** Iniciação Científica

## **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE UMA ISOFORMA DE TROMBINA-LIKE DE BOTHROPS PICTUS (TSCHUDI, 1845)**

<sup>1</sup> Aluno de graduação. pradogisele1996@gmail.com. Autor principal

<sup>2</sup> Professor PhD. poncesoto@gmail.com. Co-autor

<sup>3</sup> Doutor. gabrielprates1996@gmail.com. Co-autor

<sup>4</sup> Doutora. rmestas18@yahoo.es. Co-autor

<sup>5</sup> Aluno de pós-graduação. mifave\_11@hotmail.com. Orientador

# CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE UMA ISOFORMA DE TROMBINA-LIKE (TL-BP-2) COM ATIVIDADE SERINOPROTEASE DE *Bothrops pictus* (TSCHUDI, 1845) "JERGÓN DE LA COSTA"

## 1 INTRODUÇÃO

Com notável frequência, acidentes envolvendo serpentes do gênero *Bothrops*, ocorrem no território peruano. A serpente *Bothrops pictus* (Tschudi, 1845) é uma espécie importante já que além de ser endêmica do Peru (Bellido, 2014) a presença de um princípio coagulante sinalizaria claramente sua relação com a atividade tóxica de sua peçonha, pois geraria sérios e rápidos transtornos na coagulação. Os venenos de cobra são ricos em substâncias farmacológicas e bioquimicamente ativas. (Mestas, 2013). O veneno de *B. pictus* possui uma atividade eminentemente proteolítica e pró-coagulante, sugerindo a presença de enzimas serinoproteasas, capazes de atuar ao nível da cascata de coagulação sanguínea, especificamente na via fibrinogenolítica (Fator I) e receberam o nome de Trombina "like". No presente trabalho estrutural e funcionalmente uma isoforma de enzima "semelhante" a trombina a partir do veneno total da "jergón da costa".

## 2 METODOLOGIA

O veneno foi fornecido pelo Departamento Acadêmico de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Nacional de Trujillo. Os estudos necessários para caracterização estrutural da proteína foram realizados no Laboratório de Espectrometria de Massas Thomson, do Instituto de Química UNICAMP na responsabilidade do Prof. Luis A. Ponce Soto Ph. D. realizou-se duas etapas cromatográficas: cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-50; a trombina "like" foi obtida com um alto grau de homogeneidade molecular e pureza, sem perda de atividade biológica.

A determinação da atividade fibrinogenolítica foi medida quantitativamente pelo método descrito por Ware e Seegers (1949). O fibrinogênio bovino 2 mg/mL (0,2%) foi utilizado como substrato para o TL-Bp-2. A mistura para o ensaio de atividade coagulante continha 900µL da solução de fibrinogênio (0,2%), 100µL de CaCl<sub>2</sub> (10mM) e 20µL da amostra, para um volume final de 1020 µL. A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação primeiro sinal de formação da rede de fibrina, após a adição de 20 µL de amostra sobre o substrato de fibrinogênio previamente incubado com CaCl<sub>2</sub> 10 mM a 37C° por 10 minutos (m/v, dependendo das proteínas coaguláveis), em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4. O tempo máximo de reação para a formação da rede de fibrina é 2 minutos. Porque neste intervalo há uma relação retilínea entre os inversos dos tempos de coagulação e as respectivas concentrações proteicas.

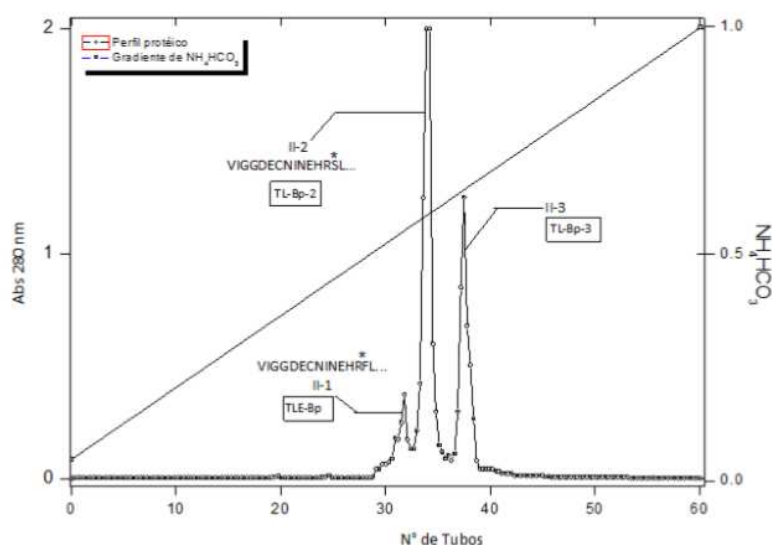
Para a degradação do fibrinogênio foi realizado num gel descontínuo de Poliacrilamida (SDS-PAGE) seguindo o método estabelecido por Ware y Seegers (1949) e modificada por Rodrigues et al.,(2000). Se misturou 450µL de fibrinogênio bovino (2 mg/mL tampão Tris-HCl 10mM pH 7,8) com 50µL de uma solução salina (CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7,8), preincubou-se

por 10 minutos a 37 °C. Depois se adicionou 10µL da enzima TL-Bp-2 e as misturas foram incubadas por diferentes períodos de tempo (0 Hrs, 1 Hr, 2 Hrs, 3 Hrs, 6 Hrs, 9 Hrs, 12Hrs, 15hrs e 24 Hrs). Logo desses tempos, as reações foram interrompidas com 300 µL de uma solução desnaturante (8,5 M Ureia, 10% β Mercaptoetanol, 2% SDS; 0,002 M EDTA; 0,02 M Tris-HCl pH 8,0) para depois ser sometidas a SDS-PAGE.

### 3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Vivas, et al. (2015), realizaram a caracterização bioquímica e molecular da proteína coagulante de *B. pictus* registrada por Mesía et al., (2011), por amplificação do gene do cDNA; A enzima foi purificada em 3 etapas: cromatografia de troca iônica em CM-Sephadex-C50, filtração em Sephadex G-100 e Sephadex G-75, no presente trabalho, a partir do veneno de “jergón de la costa” submetidos à cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de troca iônica, foi isolada uma suposta isoforma de trombina "like", não descrita na literatura. A trombina "like" isolada na fração II foi denominada TL-Bp-2 (Thrombina "like" de *Bothrops pictus*). Sua presença foi caracterizada pela atividade fibrinogenolítica no fibrinogênio bovino. Deve-se notar que a principal característica do presente protocolo de purificação é sua velocidade e alta recuperação da fração sem perda de atividade biológica durante o processo de purificação, o que pode ser traduzido em termos ótimos de custo-benefício.

Figura 1. Perfil cromatográfico de troca iônica da fração II da purificação com cromatografia de Interação hidrofóbica com atividade trombina-like da peçonha de *Bothrops pictus* (15 mL) em uma coluna de troca iônica em sulfopropil sephadex C-50 (1.2 X 6.5 cm). Se identificaram 3 frações, fundamentalmente II-2 e II-3 correspondendo às frações com atividade trombina-like. Sendo a fração II-1 diferente da II-2 desde o ponto de vista estrutural ao apresentar ao menos uma diferença na sua sequência N-terminal (TLE-Bp F14 (\*) e TL-Bp-2 S14 (\*)).



A caracterização estrutural realizou-se através da massa molecular via espectrometria de massas. A TL-Bp-2 sometida a eletroforeses em SDS-PAGE, mostrou uma massa relativa de 31 kDa em condições redutoras e com maior exatidão mediante espectrometria de massas MALDI-TOF com uma massa molecular de 26,297 kDa.

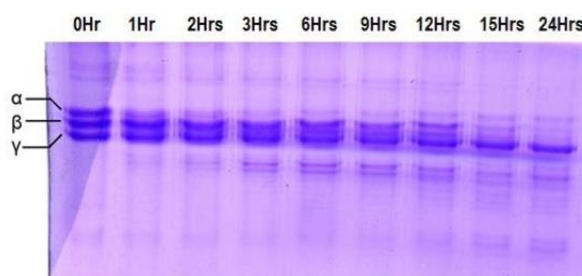
Para o análise estrutural da sequência foi suficiente a sequência de 5 peptídeos trípticos gerados a partir da fração II-2 da cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-50, os quais foram submetidos a um análise de homologia sequencial utilizando a base de dados <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>, com o qual se conferiu que esta serinoproteasa é uma isoforma de TLE-Bp (Vivas et al.2015).

Tabela 1. Massas moleculares e sequencia de aminoácidos de cinco peptídeos trípticos da TL-Bp-2 obtidas por espectrometria de massas. Os peptídeos foram separados por Cromatografia de alta eficiência (HPLC de fase reversa). Os resíduos de arginina e lisina mostrados em negrito foram deduzidos da clivagem pela tripsina. Todas as massas moleculares são reportadas como monoisotópicas.

Fracción de TL-Bp-2 HPLC	Masa Medida (Da)	Secuencia de Aminoácidos	Masa Teórica (Da)
1	1511.6787	VIGGDECNINEHR	1511.6635
2	1435.6952	SLMNIYLGMHNK	1435.7007
3	808.3351	FDDEQR	808.3499
4	753.4609	LNRPVR	753.4270
5	1732.8237	VLCAGVLEGGIDTCNR	1732.8118

A fração de TL-Bp-2 do pico II-2 da cromatografia de troca iônica evidenciou atividade fibrinogenolítica sobre o fibrinogênio bovino comercial (2 mg / ml) em pH 7,8 hidrolisando a cadeia alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) e comportando-se como uma trombina "like" tipo venombina AB.

Figura 2. Eletroforeses (SDS-PAGE 12,5%) que mostra a degradação dos fibrinopeptídeos  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio bovino pela ação da TL-Bp-2 a diferentes tempos de incubação a 37°C: 0 Hrs, 1 Hr, 2 Hrs, 3 Hrs, 6 Hrs, 9 Hrs, 12Hrs, 15Hrs e 24 Hrs.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Foi possível purificar uma serinoprotease com atividade fibrinogenolítica chamada Trombina "like" (TL-Bp-2) do veneno de *Bothrops pictus* do departamento de La Libertad - Peru, através de dois passos cromatográficos de Interação Hidrofóbica (HIC) e troca iônica SP-Sephadex C-50 (IIC).
2. A serinoprotease de trombina "like" TL-Bp-2 apresentou um alto grau de homogeneidade Eletroforese em gel molecular SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras, com Massa molecular relativa de 31 kDa e por espectrometria de massas foi obtida massa 29,297 kDa.
3. Estudos de homologia sequencial confirmaram que a serinoprotease TL-Bp-2 é uma isoforma da trombina "like" de *B. pictus*, apresentando um alto grau de similaridade com a estrutura primária TLE-Bp de *B. pictus* registrado por Vivas et al., 2015.
4. TL-Bp-2 pela hidrólise das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio bovino, provavelmente possa ser agrupada no grupo de serinoproteases venombina AB.

## REFERÊNCIAS

- Bellido, C. (2014). Purificación y Caracterización de una Metaloproteasa Hemorrágica del veneno de la serpiente del Perú *Bothrops pictus* (Tschudi, 1845) "Jergón de la Costa". Tesis para optar el título Profesional de Biólogo, Genetista Y Biotecnólogo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Mesía, M., Manrique, F. y Yarlequé, A. (2011). Purificación y Caracterización de un nuevo principio coagulante del veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus*. Rev Soc Quím Perú, 77:182190.
- Mestas, R. (2013). Estructura primaria de una PLA2 básica, miotóxica local y sistémica, deducida a partir de mRNA extraído de veneno total de *Crotalus durissus terrificus*. Tesis para optar al Grado académico de Magister en Biología molecular. UNMSM. Lima-Perú.
- Rodrigues, V., Soares, A., Guerra-as, R., Rodrigues, V., Fontes, M. y Giglio, J. (2000). Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrinogenolytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. Arch. Biochem. Biophys, 381:213224.
- Vivas, D., Sandoval, G., Lazo, F., Rodríguez, E., Yarlequé A. y Flores, E. (2015). Caracterización de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops pictus* "Jergón de costa". Rev Peru Med Exp Salud Publica, 32(4):652-658.
- Ware A. y Seegers, W. (1949). Two-stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration. Am. J. Clin. Pathol., 19:471.

