

Purificação de Serinoproteases Plasmáticas e Análise da viabilidade funcional de inibidores de serinoproteases sintéticos.

Lays Costa Marques, Ivan Torres Nicolau Campos.
Instituto de Ciências Biológicas, UFG, 74001970, Brasil.
e-mail: layscm@hotmail.com, ivan@icb.ufg.br

PALAVRAS CHAVE: Cascata da coagulação, Serinoproteases, Fator XII.

1. INTRODUÇÃO

A cascata da coagulação, modelo introduzido no início do ano de 1960, geralmente é definida como uma série de reações proteolíticas sequenciais, pelos quais os fatores de coagulação do sangue interagem e são ativados gerando fibrina, a principal componente do trombo (MONTEIRO, 2005). Essa cascata opera na trombose venosa e arterial e ocorre através da convergência das duas cascatas, designadas vias extrínsecas e intrínsecas em uma via comum (KLEINSHCHNITZ et al., 2006).

A coagulação da via extrínseca é iniciada pelo fator tecidual (FT), uma proteína transmembrânica exposta na parede do vaso lesado, que se liga ao fator de coagulação VII(a). O complexo Fator VIIa-FT ativa o fator X (GEBBINK et al, 2009).

A via intrínseca é desencadeada pela ativação por contato de proteínas presentes no plasma como o fator de coagulação XII (RENNÉ et al, 2005), em uma reação envolvendo a pré-caliceína (PK). Fator XII se liga a superfícies carregadas negativamente e torna-se fracamente ativado, ativando proteoliticamente a caliceína e esta por sua vez é capaz de ativar o fator XII proteoliticamente. Este leva a ativação proteolítica sequencial de FXI e FIX que levará à ativação do Fator X (RENNÉ; NIESWANDT; GAILANI, 2006; GEBBINK et al, 2009). O Fator X é o ponto chave de convergência das duas vias e culminam na geração de trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina e ativa as plaquetas (WARREN et al., 2009). Por sua vez, as plaquetas ativadas promovem a geração de trombina por várias ordens de grandeza, pela exposição da fosfatidilserina pró-coagulante na sua superfície exterior (RENNÉ; NIESWANDT; GAILANI, 2006).

Deficiências de elementos presentes na cascata, *e.g.* fator XIII, fator IX e fator XI levam a transtornos hemorrágicos. Isso mostra que a parte inicial da via intrínseca da coagulação contribui para a hemostasia fisiológica. Paradoxalmente, deficiências no contato primário nos fatores XII, PK ou HK, que ativam a via intrínseca, não são associados com um

fenótipo de sangramento. Isso sugere que estes três fatores não contribuem para esse papel fisiológico da via intrínseca (GEBBINK et al., 2009). Essa contradição se explica após a identificação de uma via alternativa de ativação do fator XI: trombina, gerada pela via extrínseca ativa o FXI, FVIII e FV, resultando em aumento da produção de FIXa e FXa, aumentando assim a produção de trombina (SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005).=

A Trombina possui várias ações hemostáticas, incluindo ativação dos fatores V, VII, VIII, XI, e estimulação do funcionamento subendotelial de células musculares para que se contraiam, e portanto, estancar a perda de sangue de um vaso lesionado. No entanto, as principais ações da trombina são clivar o fibrinogênio em fibrina, ativar o fator XIII, ativar plaquetas através de receptores específicos de trombina, e estimular as células endoteliais para produzir o fator de Von Willebrand auxiliando a agregação plaquetária. Além do sistema de coagulação, a trombina possui uma ampla variedade de ações e é um dos principais mediadores inflamatórios, estimulando a produção de quimioatraentes e de substâncias vasoativas, que promovem aderência dos neutrófilos, atraem macrófagos e aumentam a permeabilidade vascular (WARREN et al., 2009).

Estes processos, coletivamente chamados de reações de ativação de contato, iniciam vários sistemas de defesa plasmáticos, incluindo formação de fibrina, a fibrinólise, ativação complemento e geração de cininas (GALIANI; RENNÉ, 2007). As substâncias vasoativas, enzimas, e micro embolias produzidos por esses mediadores ativados iniciam todo o corpo da resposta inflamatória (WARREN et al., 2009).

O sistema complemento é formado por um grupo de glicoproteínas circulantes, que fazem parte do sistema imune. Este sistema inicia e amplifica a resposta inflamatória e age como um complemento à imunidade humoral, mediada por anticorpos contra infecções microbianas (WARREN et al., 2009). O sistema complemento além de seus mediadores próprios é ativado indiretamente pelo fator XII da coagulação. A plasmina originada na cascata da coagulação iniciada pelo fator XII é um dos elementos estimuladores da expressão do complemento, outro estimulador direto desse sistema é a trombina também gerada por meio do Fator XII (MOURA; POMERANTZEFF; GOMES, 2001).

Esse sistema é responsável por estimular a liberação de mediadores químicos pelos mastócitos, *e.g.* histamina, ativar o metabolismo do ácido araquidônico, produzindo e liberando mais mediadores da inflamação como prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos e ainda promover a ativação dos leucócitos, adesão e quimotaxia, com posterior liberação das citocinas (MOURA; POMERANTZEFF; GOMES, 2001).

O fator de coagulação XII também conhecido como fator de Hageman foi descoberto em 1955, em um homem conhecido como John Hageman, este apresentava um tempo de coagulação prolongado, embora não tivesse sintomas hemorrágicos. A partir desse fator o Dr. Oscar Ratnoff descobriu que John Hageman possuía deficiência de um fator de coagulação até então desconhecido, o qual recebeu o nome de Hageman (COOL, MACGILLIVRAY, 1987).

O fator XII é uma proteína plasmática que circula no sangue na sua forma inativa, esta quando ativada a fator FXIIa, se torna uma enzima da classe das serinoprotease ou serinoendopeptidase, responsáveis pela quebra de ligações peptídicas de aminoácidos não terminais (GORDON et al, 1990). A ativação do fator XII seja por auto-ativação ou por ativação pela calicreína resulta na clivagem da ligação Arg353-Val354, gerando uma cadeia pesada e uma leve contendo 353 e 243 resíduos de aminoácidos, respectivamente, e unidas por uma ponte dissulfeto. A cadeia pesada é responsável pela ligação a polianions e a cadeia leve contém o domínio catalítico (SCHOUSBOE, 2008).

Recentes estudos em ratos, relacionados ao fator XII indicam que sua ausência na via intrínseca não é importante para a coagulação normal, entretanto esta protease tem uma importante contribuição na formação patológica de trombos vasculares (RENNÉ, 2005; GAILANI; RENNE, 2007). Estas experiências demonstraram que a formação de fibrina mediada pelo FXII é crucial para a trombose arterial patológica, mas não para a homeostasia e, portanto, sugerem que FXII pode ser um alvo ideal para a anticoagulação segura e um novo alvo para terapia antitrombótica (SCHOUSBOE, 2008).

2. OBJETIVOS

Obter serinoproteases plasmáticas e confrontá-las com os inibidores sintéticos.

Objetivos específicos:

- Purificar fator XIIa plasmático bovino
- Caracterizar os inibidores sintéticos frente às proteases

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção dos exemplares

Sangue de *Bos taurus* foram obtidos de animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. O sangue (200 ml) foi extraído com o auxílio de cateter 3G e coletado em frascos de PET contendo 50 ml de solução Citrato de Sódio 0,5M, pH 5,0 contendo benzamidina 31mg/mL. O material foi centrifugado a 12.000xg por 20 minutos a 2°C para remoção de células e partículas insolúveis, e o plasma foi alíquotado e armazenado em freezer a -25°C até o uso.

3.2 Processos da purificação e enzimática

Ao plasma (40 mL) foram adicionados com 2 mL de Tris-HCl 1M, pH 8,0, misturado a 10ml de resina DEAE-Celulose pré-equilibrada com solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, deixando homogeneizando por inversão por 30 minutos a 4°C. A resina foi decantada por 30 minutos e o material não ligado a resina (sobrenadante) extraído e acidificado com 2 mL de acetato de sódio 0,1M e cloreto de sódio 0,25M, pH 5,0. A amostra foi deixada *overnight* à temperatura de 4°C. O material foi centrifugado à 4200xg, por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante aplicado a uma cromatografia troca iônica em coluna SP-Sephadex (10ml) pré-equilibrada com solução tampão acetato 0,1M pH 5,0. Eluições foram realizadas utilizando-se tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 contendo concentrações crescentes de NaCl (0.2M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.0M, 1.5M), coletando-se frações de 7mL, as quais foram então analisadas quanto ao conteúdo proteico e a atividade enzimática específica.

3.3 SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada pelo método descrito por Laemmli (1970). Usando gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS (0,1%), o experimento foi feito com voltagem constante de 100V por 3h, à temperatura ambiente. O gel foi corado pela coloração de Coomassie Blue R-250 (0,25%). O padrão de massa molecular utilizado foi adquirido da BioRad® (“Precision Plus Protein Dual Color Standards”).

3.4 Análise em Zimograma

O zimograma foi realizado utilizando SDS-PAGE 10% contendo 0,5% de gelatina ou 1% caseína. A eletroforese ocorreu a 15A a temperatura ambiente (25°C), sendo posteriormente o gel incubado em Tris-HCl 50mM contendo Triton X-100 2% (v/v) 1h, a

temperatura ambiente, sob agitação, para remoção do SDS. Após a incubação, os géis foram lavados e incubados com tampão 50mM Tris-HCl e NaCl 150mM, pH 8,0, por 12 horas, a 37°C. A atividade foi revelada pela coloração com “Coomassie Blue” R250 (0,25%).

3.5 Ensaio enzimático

Para determinação da atividade enzimática, foi observada a hidrólise do substrato azocaseína. A 40µL de Tris-HCl 50mM pH 8.5 foram adicionados a amostra (20 µL) e o substrato (azocaseína 1% p/v em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0). A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após incubação foram adicionados 100 µL de TCA 10% (ácido tricloroacético), a reação foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e a mesma foi centrifugada a 2500g por 20 min. A 100µL do sobrenadante foram adicionados 100 µL de NaOH 1M. A atividade enzimática foi determinada pela leitura espectrofotométrica realizada a 450 nm

Alternativamente, a atividade enzimática foi determinada pela hidrólise de solução de substrato cromogênico BAPNA (N α -benzoi- DL-arginil-p-nitroanilida). O substrato (incolor) quando clivado gera benzoi-arginina e p-nitroanilina (amarela). O ensaio foi realizado em duplicata, utilizando-se 40µL de BAPNA 4mM dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido), 40µL de Tris-HCl 50mM pH 8,0 e 20µL da amostra em placas de 96 poços. O ensaio ocorreu por 10 minutos a 37°C e a reação foi interrompida pela adição de 40µL de ácido acético 30% p/v. A liberação do produto (p-nitroanilina) foi acompanhada em espectrofotômetro de microplaca a λ 405nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir do sangue bovino, realizou-se a purificação do fator XIIa do mesmo. Para tal o sangue foi coletado em frascos de PET (Politereftalato de Etileno) contendo citrato de sódio e benzamidina. Um dos problemas em se trabalhar com plasma é a possibilidade de inicialização da coagulação do mesmo e para tal, foi evitado o contato do material com vidro, cuja carga negativa é capaz de ativar o fator XII. Ainda para tal finalidade, foi utilizado para a coleta do sangue, citrato de sódio (quelante de cálcio, cofator da coagulação sanguínea) e benzamidina (inibidor reversível de serinoproteases). Desta forma, assim que coletado, o sangue foi prontamente centrifugado para a obtenção do plasma. O próximo passo de purificação foi a utilização de uma resina de troca-iônica (DEAE-Celulose), para remoção de cinogênio de alta massa molecular. Em sequência, o material foi acidificado para

precipitação de parte do material contaminante bem como para adequação às condições de realização da cromatografia subsequente. O material precipitado foi separado por centrifugação e o material contendo o fator XII foi aplicado em uma coluna SP-Sephadex. Esta foi lavada e a eluição dos materiais ligados deu-se por competição por aumento em etapas da concentração de NaCl do tampão. Após a eluição as frações foram testadas quanto a atividade enzimática bem como foram analisadas em SDS-PAGE.

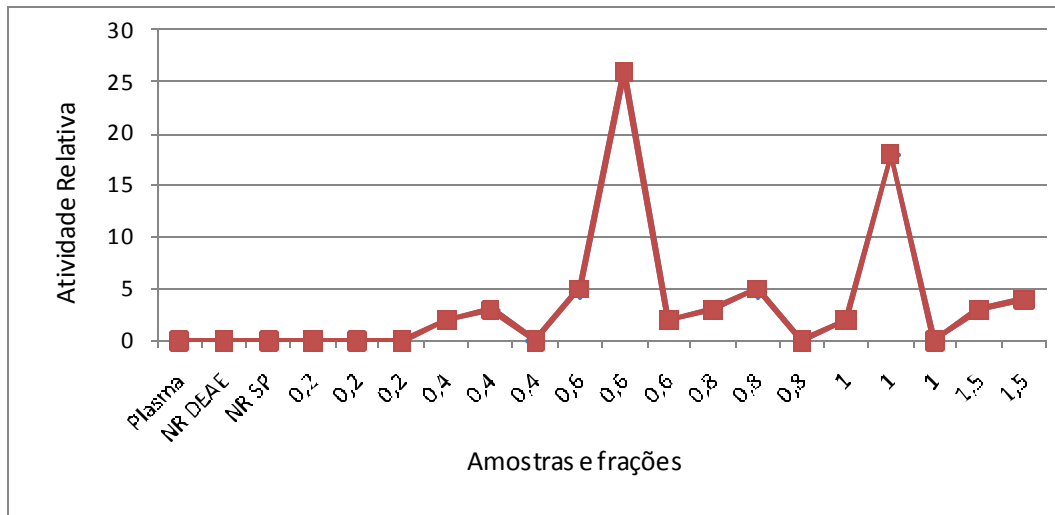


Figura 1. Análise da atividade hidrolítica das amostras e frações. Plasma: 20 uL de plasma. NR DEAE: Material não retido em resina DEAE-Celulose. NR SP: Material não retido em cromatografia em resina SP-Sephadex. 0,2-1,5: Frações do material eluído da cromatografia de troca iônica em coluna SP-Sephadex.

Observa-se que a maior parte da atividade hidrolítica foi eluída com tampão contendo 0.6 M de NaCl e outra fração da atividade foi eluída com tampão contendo 1.0 M de NaCl. Ressalta-se que as frações: Plasma, Material não retido em DEAE e Material não retido em SP não apresentaram atividade hidrolítica frente ao BAPNA, o que era esperado pois as mesmas contém benzamidina que inibe inespecificamente quaisquer serinoprotases que estariam presentes. Claves e Collen (1978) mostraram em um trabalho de purificação de fator XII que o fator XII quando em sua forma de zimogênio quando aplicado em cromatografia de troca iônica em uma coluna SP-Sephadex, elui na segunda metade de um gradiente de 0-1M NaCl. Confrontando-se o resultado enzimático da cromatografia com o SDS-PAGE, notamos que a fração 0.6 apresenta uma alta pureza, sendo observada duas bandas próximas com massa molecular próxima a esperada para o fator XII bovino (74kDa).

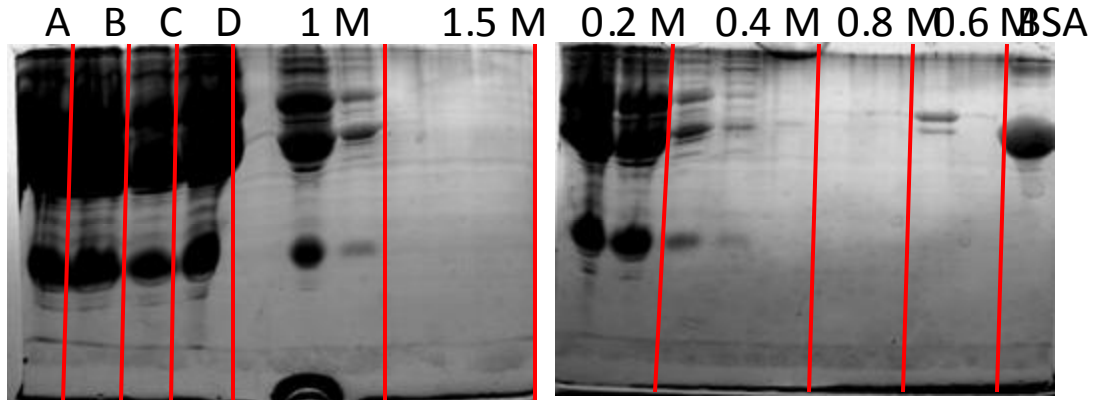


Figura 2 . SDS PAGE com 20 μ L de amostra aplicada depois de precipitada em 400 μ L de acetona. Eletroforese carreada em gel de poliacrilamida a 12,5% não reduzido. A: Plasma descongelado; B: Material não retido em cromatografia em resina DEAE-Celulose; C: Material sobrenadante de centrifugação após cromatografia em DEAE-Celulose; D: Material não retido em cromatografia em resina SP-Sephadex. 0.2M-1.5M: Frações do material eluído em cromatografia de troca iônica em coluna SP-Sephadex, os valores representam as respectivas concentrações de NaCl presentes no tampão eluidor, que também contém acetato de sódio 0,1M; BSA: Albumina.

Uma análise mais detalhada (figura 3) mostra bandas menores em torno de 50 kDa e 25kDa, tamanhos esperados para o produto de ativação do fator XII em gel redutor.

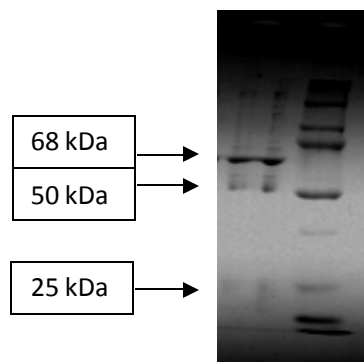


Figura 3 . Precipitação em acetona de material eluído da cromatografia de troca iônica em coluna SP-Sephadex, fração de 20 μ L aplicada referente a eluição em NaCl 0,6M e acetato de sódio 0,1M. SDS PAGE, com gel de poliacrilamida a 12,5% reduzido. As subunidades 50kDa e 25 kDa correspondem ao tamanho esperado dos produtos ativados do fator XII.

Dando procedimento à caracterização dos materiais tentou-se a realização de zimografias em gel contendo gelatina ou caseína porém o procedimento não obteve sucesso, devido provavelmente à alta especificidade de substratos do fator XIIa bem como a possível instabilidade já mencionada na literatura do fator XII. Desta forma, não foi possível correlacionar qual o material presente na fração eluída com 1M NaCl responsável pela

atividade proteolítica observada nesta fração, o que contribuiria para a confirmação da purificação do fator XII junto à fração 0.6M. Para a identificação do responsável pela atividade observada na fração 1M, pretende-se realizar uma cromatografia de gel-filtração em busca da fração ativa para confronto de massa molecular. Ainda, estamos trabalhando na caracterização dos materiais presentes na fração 0.6M para confirmação da identidade.

O confronto das atividades com inibidores sintéticos em desenvolvimento será realizado assim que os mesmos forem disponibilizados pelos colaboradores.

5. CONCLUSÕES

O trabalho atualmente encontra-se ainda em desenvolvimento e apesar de um início lento, recentemente seu desenvolvimento tem-se acelerado. Duas atividades proteolíticas plasmáticas foram parcialmente purificadas e apesar de ambas carecerem de uma caracterização conclusiva, ambas já podem ser utilizadas em ensaios frente a inibidores sintéticos baseados em inibidores protéicos naturais. Ademais, apesar da instabilidade observada nas amostras, atualmente o protocolo de purificação está em fase final de refinamento o que proporcionará a obtenção do material desejado em grandes quantidades. Desta forma temos como perspectiva finalizar a otimização da purificação dos materiais, caracterizá-los quanto a identificação molecular e realizar os ensaios inibitórios programados assim que os inibidores estiverem disponíveis.

6. REFERÊNCIAS

CLAYES, H.; COLLEN, D. **Purification and Characterization of Bovine Coagulation Factor XII (Haegman Factor)**. European Journal of Biochemistry, 1978; v.87. p.69-74.

COOL, D. E.; MACGILIVRAY, R. T.A. **Characterization of the human blood coagulation factor XII gene**. Intron/exon gene organization and analysis of the 5'-flanking. The Journal of Biological Chemistry, 1987; v.262(28). p. 13662-73.

GEBBINK, M.F.B.G et al. **Physiological responses to protein aggregates**: Fibrinolysis, coagulation and inflammation (new roles for old factors). FEBS Letters, 2009; v.538(16). p.2691-9.

GORDON, E.M. et al. **Hepatocytes express blood coagulation XII (Hageman factor).** Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1990; v.115(4). p. 463-9.

KLEINSCHNITZ, C. et al. **Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis.** The Journal of Experimental Medicine, 2006; v.203.

MONTEIRO, R.Q. **Targeting exosites on blood coagulation proteases.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2005; v.77(2). p.272-280.

MOURA, H. V.; POMERANTZEFF, P. M. A.; GOMES, W. J. **Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas.** Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, 2001; v.16 n. 4, p. 376-87.

RENNÉ, T. et al. **Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII.** The Journal of Experimental Medicine, v.2005; 202(2). p.271-28.

RENNÉ, T.; NIESWANDT, B.; GAILIANI, D. **The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice.** Blood Cells, Molecules and Diseases, 2006; v.36. p.148-151.

SCHOENMAKERS, S.H.H.F.; REITSMA, P.H.; SPEK, C.A. **Blood coagulation factors as inflammatory mediators.** Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2005; v.34. p.30-37.

SCHOUSBOE, I. **Pharmacological regulation of factor XII activation may be a new target to control pathological coagulation.** Biochemical Pharmacology, 2008; v.75. p.1007-1013.

WARREN, O.J. et al. **The inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass: Part 1- Mechanisms of Pathogenesis.** Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 2009; v.23(2). p.223-231.