

**Jorge Miguel Vieira de Frias**

**Potencial da diversidade microbiana dos Açores  
na saúde: screening, purificação e caracterização  
de uma enzima trombolítica.**



**Universidade dos Açores**

**Departamento de Biologia**

**2014**

**Jorge Miguel Vieira de Frias**

**Potencial da diversidade microbiana dos Açores  
na saúde: screening, purificação e caracterização  
de uma enzima trombolítica.**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, sob orientação do  
Professor Doutor Nelson José de Oliveira Simões e Doutor Duarte Nuno Tiago Toubarro.**



**Universidade dos Açores**

**Departamento de Biologia**

**2014**

## Índice

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
I – Introdução .....	7
1. Formação e terapia do coágulo sanguíneo.....	7
1.1. Processo de coagulação .....	8
1.2. Estabilização do coágulo .....	9
1.3. Fibrinólise.....	10
1.4. Patologias associadas com a fibrinólise.....	11
1.5. Terapia trombolítica .....	12
2. Fontes de enzimas fibrinolíticas .....	14
2.1. Bactérias .....	14
2.2. Outros microrganismos.....	16
2.3. Outros organismos .....	16
3. Família das serina-proteases.....	17
II - Materiais e Métodos .....	20
1. Material Biológico .....	20
1.1. Bactérias .....	20
1.2. Nemátodes .....	21
2. Extração de proteases das bactérias .....	21
2.1. Cultura das bactérias.....	21
2.2. Obtenção do sobrenadante da cultura bacteriana .....	21
3. Extração de proteases do nemátode .....	21
3.1. Indução do estado parasitário .....	21
3.2. Obtenção do ESP (excreted/secreted products) .....	22
4. Confirmação da actividade proteolítica.....	22
4.1. Ensaio com Azoalbumina 2% .....	22
4.2. Ensaio em placa de caseína 1% .....	22
5. Preparação de placas para fibrinólise .....	23
5.1. Screening em placa de fibrina.....	23
6. Extração de DNA, identificação molecular por PCR-ARDRA e sequenciação .....	24
7. Análise da sequência do isolado S127e.....	25
8. Zimograma com fibrina.....	26
9. Fraccionamento por cromatografia .....	26
10. SDS-PAGE .....	28
11. Análise de espectrometria de massa (Ms/Ms) da proteína .....	28
12. Caracterização Bioquímica da enzima .....	29
12.1. Efeito do pH, temperatura, iões/solventes e inibidores.....	29

12.2. Substratos específicos .....	30
13. Actividade fibrinolítica .....	30
13.1. Aplicação das amostras em placa de fibrina .....	30
13.2. Aplicação das amostras com plasminogénio na placa de fibrina .....	31
14. SDS-PAGE fibrinogenolítico .....	32
15. Actividade Trombolítica <i>in vitro</i> .....	33
16. Influência/acção da enzima no tempo de coagulação.....	34
17. Tempo de lise da Euglobulina .....	35
18. Ensaio de citotoxicidade .....	36
18.1. Ensaio de citotoxicidade MTT .....	36
18.2. Ensaio hemolítico .....	37
III - Resultados .....	38
1. Actividade proteolítica dos microorganismos .....	38
2. <i>Screening</i> de actividade fibrinolítica .....	40
2.1. Ensaio em placa de fibrina para detecção de actividade fibrinolítica .....	40
2.2. Actividade estimada a partir das unidades de actividade da urokinase .....	41
3. Identificação genética dos isolados com base no perfil PCR-ARDRA .....	42
4. Identificação do isolado S127e com base na análise da sequência 16s .....	44
5. Perfil enzimático das amostras com actividade fibrinolítica .....	45
6. Purificação da enzima fibrinolítica do isolado S127e .....	47
6.1. Actividade das fracções obtidas ao longo das separações cromatográficas .....	47
6.2. Etapas de purificação da proteína .....	49
7. SDS-PAGE das fracções da purificação .....	50
8. Identificação da proteína fibrinolítica por Ms/Ms.....	52
9. Caracterização bioquímica da enzima .....	53
9.1. Condições óptimas de funcionamento da enzima .....	53
9.2. Efeito dos diversos iões/solventes e dos inibidores na actividade enzimática .....	54
9.3. Substratos específicos .....	56
10. Determinação da actividade fibrinolítica da fracção pura .....	57
11. Actividade Fibrinogenolítica.....	59
12. Actividade Trombolítica <i>in vitro</i> .....	60
13. Influência no tempo de coagulação e lise do coágulo plasmático .....	62
14. Ensaio de citotoxicidade da fracção enzimática pura .....	64
IV - Discussão .....	66
V – Considerações Finais .....	74
VI - Bibliografia .....	75

## **Agradecimentos**

Depois de concluída esta árdua e gratificante tarefa, quero deixar o meu grande e sincero agradecimento a todas as pessoas que apoiaram e contribuíram, de uma forma directa ou indirecta, para a realização deste trabalho, pois sem eles nada disto seria possível.

Ao Professor Doutor Nelson Simões, meu orientador neste longo trabalho de pesquisa e dissertação de mestrado, deixo uma palavra de estima e admiração, por ter-me acolhido na sua equipa de trabalho e pela transmissão de um vasto conhecimento, mérito e rigor científico que me foram essenciais para a conclusão deste processo de investigação.

De referir também o mérito e grande papel do Doutor Duarte Toubarro, onde para além de orientador, foi também como um colega de trabalho, ajudando em todo o processo de investigação no que toca à componente prática laboratorial, transmitindo experiências, ensinamentos, confiança e que procurou sempre a minha motivação neste longo trabalho de pesquisa.

Deixo também uma palavra de agradecimento à Professora Carla Mendes Cabral, directora do Mestrado em Ciências Biomédicas, pelo interesse demonstrado na minha investigação e pela transmissão de conhecimentos ligados à microbiologia, que me foram uteis no decurso do trabalho prático.

Quero também mencionar a disponibilidade, ajuda, simpatia e momentos de diversão que a Dr.<sup>a</sup> Analuce Gouveia, Dr. Mário Teixeira, Dr.<sup>a</sup> Mafalda Raposo e o Sr.<sup>o</sup> Pedro prestaram ao longo de todo o meu trabalho no laboratório.

São também dignos de uma nota de apreço os meus colegas do Mestrado e Licenciatura, pela união e partilha de informações demonstrada no que toca a assuntos relacionados com o curso.

No contexto mais pessoal, não podia deixar de referir o grande incentivo e apoio que recebi da minha família, nomeadamente do meu Pai e irmãos. Foram o meu pilar para a conclusão desta dissertação de mestrado, sem a ajuda e colaboração deles, nada disto teria sido possível. Por fim, agradeço à Nilsa, a minha companheira carinhosa e aconchegante que me apoiou e incentivou nesta fase final da dissertação.

## Resumo

Nesta tese, foram seleccionados 24 isolados da ilha de S. Miguel pertencentes ao banco de *Bacillus* spp. do grupo de entomoparasitologia e o nematode *Steinernema carpocapsae* pertencente à colecção entomopatogénica da Universidade dos Açores, para a realização de um *screening* de actividade fibrinolítica. O objectivo desta tese foi a extracção, purificação e caracterização de uma enzima fibrinolítica a partir do sobrenadante do meio de cultura do isolado que registou a maior actividade nos ensaios de *screening* de actividades com substratos generalistas e em placa de fibrina. Foram detectados 6 isolados bacterianos com actividade fibrinolítica: S150c, S127e, S147e, S157e, S159c e S126e. O excretado/secretado do nematode com actividade fibrinolítica apareceu ao décimo terceiro dia e entre o vigésimo segundo dia e o vigésimo oitavo dia após o início do estado de juvenis infectantes, em resistência trófica. A maior parte dos isolados em que se detectou actividade fibrinolítica pertencem ao grupo genético VII, que corresponde às espécies *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus* e *B. amyloliquefaciens*. O isolado S127e, foi seleccionado para dar continuidade ao estudo desta tese, pelo facto de ter sido a estirpe que produziu a maior actividade fibrinolítica e por apresentar um perfil proteico no zimograma com uma banda de digestão bem definida com cerca de 40 kDa. A análise da sequência do gene 16S rRNA do isolado S127e, indica uma grande identidade com as espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Foi possível purificar a enzima fibrinolítica com um factor de purificação de 1114. Esta enzima à qual designamos por BK (Bacillus-kinase) tem um peso molecular de aproximadamente 27 kDa e foi identificada por espectrometria de massa como sendo uma proteína homóloga a uma enzima fibrinolítica de *M. luteus* e a uma enzima bacteriolítica (*lytic enzyme L27*) de *B. subtilis*. A temperatura óptima da enzima BK situa-se entre os 37°C e os 48 °C e possui um pH óptimo de 7. O magnésio e o cálcio provaram ser os cofactores ideais para o funcionamento da enzima. A análise dos resultados obtidos nos ensaios com inibidores e substratos específicos permitiram concluir que esta enzima pertence à família das serina-proteases do tipo quimotripsina. A actividade fibrinolítica estimada da fracção pura foi de 4 U/μg e esta mostrou não activar o plasminogénio. A actividade fibrinogenolítica determinada, permitiu verificar que esta é capaz de degradar as várias cadeias do fibrinogénio em poucos minutos. Nos ensaios biológicos, a enzima apresentou uma boa actividade trombolítica *in vitro*, degradando completamente os coágulos sanguíneos ao fim de 50 minutos de incubação. Pela análise dos resultados obtidos no ensaio do tempo de coagulação e no ensaio do tempo de lise da euglobulina, conclui-se que a enzima não interfere com o processo de coagulação e que reduz significativamente o tempo de lise do coágulo de euglobulina. Os ensaios de toxicidade da enzima com células vero e com as hemácias demonstraram que esta apresenta uma taxa de mortalidade baixa ou mesmo nula.

## Abstract

In this paper, 24 strains of *S. Miguel Island* from the bank of *Bacillus* spp, named entomoparasitology group, and the nematode *Steinernema carpocapsae* from the Azorean entomopathogenic collection of the University of the Azores, were selected to carry out a fibrinolytic screening test. The goal of this paper was the extraction, purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from the culture medium of the strain with the highest activity recorded in screening tests performed with serino proteases substrates and in fibrin plate method. A total of six strains were detected with fibrinolytic activity: S150c, S127e, S147e, S157e, S159c and S126e. The fibrinolytic activity of nematode excreted/secreted products appeared with the thirteenth day and between the 22nd and the twenty-eight day after the beginning of infective juvenile state (trophic resistance). The majority of strains with fibrinolytic activity belong to the genetic group VII, which corresponds to *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. atrophaeus* and *B. amyloliquefaciens* species. The S127e strain was selected to continue this study, because it was the strain that produced the highest fibrinolytic activity and for presenting a zymogram profile with a well-defined digestion band of approximately 40 kDa. The 16S rRNA gene sequence analysis of the strain S127e shows a good identity with *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* species. It was possible to purify the fibrinolytic enzyme with a purification factor of 1114. This enzyme which we call Bacillus-kinase (BK) has a molecular weight of approximately 27 kDa and was identified by mass spectrometry as a fibrinolytic enzyme of *M. luteus* and as a bacteriolytic enzyme, named lytic enzyme L27 of *B. subtilis*. The enzyme BK optimal temperature is between 37° C and 48° C and has an optimal pH of 7. Magnesium and calcium successfully increases the fibrinolytic activity, which proves they work as enzyme cofactors. The data obtained in protease inhibitor assay and specific substrate assay shows that the enzyme BK belongs to chymotrypsin-like serine proteases superfamily. The estimated fibrinolytic activity for this enzyme is approximately 4 U/μg and this enzyme does not activate plasminogen. The fibrinogenolytic activity assay shows that enzyme BK was able to digest all fibrinogen chains in few minutes. In biological assays, the enzyme showed a good thrombolytic activity in vitro and was capable of degrading completely the blood clots after 50 minutes of incubation time. Analyzing the results obtained in clotting time assay and euglobulin clot lysis time assay, we concluded that enzyme does not interfere with coagulation cascade and significantly reduces the euglobulin lysis time. The enzyme toxicity tested on vero cells and erythrocytes shows low or even null mortality rate.

## **I – Introdução**

A equipa de entomoparasitologia da Universidade dos Açores tem uma colecção de cerca de 3000 isolados Açorianos de *Bacillus* sp. e uma colecção de nematodes que são estudados em controlo biológico por serem capazes de infectar insectos (Simões, comunicação pessoal). Neste trabalho, utilizamos 24 isolados de *Bacillus* sp. e o nematode *Steinernema carpocapsae* para a realização de um *screening* de actividades. Procedeu-se à realização de ensaios com diferentes substratos para determinar a actividade proteolítica e fibrinolítica dos microrganismos, o que permitiu seleccionar o isolado com maior actividade. Posteriormente foi possível identificar a sua espécie com base na análise do gene 16S, bem como a purificação e caracterização bioquímica da enzima fibrinolítica que este produz. A enzima fibrinolítica foi identificada com base na análise por espectrometria de massa. Para além disso, testou-se a capacidade fibrinolítica e trombolítica desta enzima através de ensaios de actividade em placa de fibrina e de ensaios biológicos *in vitro*. A citotoxicidade da proteína também foi estimada através da realização de dois ensaios, de modo a avaliar a viabilidade desta enzima ser usada como um potencial fármaco para o tratamento clínico de doenças da hemostasia.

### **1. Formação e terapia do coágulo sanguíneo**

Os coágulos sanguíneos formam-se quando ocorre acumulação de fibras de fibrina nos vasos sanguíneos. Quando ocorre no coração, os coágulos podem provocar o bloqueio do fluxo sanguíneo até ao tecido muscular (miocárdio), cortando o suplemento de oxigénio ao tecido e provocando a morte celular. Este fenómeno pode resultar na angina do miocárdio e no enfarte do miocárdio. Por sua vez, a presença de trombos nas cavidades do coração podem sofrer mobilizações através do sistema circulatório até ao cérebro. A presença de coágulos nos vasos sanguíneos cerebrais, provocam o bloqueio do fluxo sanguíneo e consequentemente o fornecimento de oxigénios às regiões vitais, o que provoca lesão local e leva ao chamado acidente vascular cerebral (AVC). As enzimas trombolítica são normalmente produzidas pelas células endoteliais que constituem os vasos sanguíneos, no entanto com o avançar da idade do organismo, a produção dessas enzimas começa a diminuir, tornando o sangue mais susceptível à coagulação. Este mecanismo pode levar a enfartes do miocárdio ou cerebral, bem como outras condições patológicas. Uma vez que as células endoteliais existem um pouco por todo o organismo, como nas artérias, veias e sistema linfático, o défice na produção de enzimas trombolíticas pode levar ao desenvolvimento de condições trombóticas virtualmente em qualquer parte do organismo.

O entupimento por trombos nos vasos sanguíneos cerebrais foi recentemente revelada como a principal causa de demência no mundo. Estima-se que os trombos são responsáveis por demências senis em 60% dos pacientes no Japão. As doenças trombóticas tipicamente incluem as hemorragias cerebrais, enfartes do miocárdio e cerebrais, e a angina do peito, mas também inclui outras doenças causadas por vasos sanguíneos com baixa flexibilidade nos casos de pacientes com demência senil ou com diabetes. Normalmente os pacientes que sofrem de enfartes do miocárdio apresentam um desequilíbrio, em que as enzimas trombolíticas estão em menor quantidade comparativamente às enzimas que fazem parte do processo de coagulação (Kotb, 2012).

### **1.1. Processo de coagulação**

O processo de coagulação actualmente é uma matéria muito bem estudada e que continua a ser tema de investigação e de novas descobertas. O artigo de Jesty & Beltrami, faz uma revisão sobre os vários mecanismos de feedback positivo da coagulação, bem como uma abordagem à fase de activação/iniciação da coagulação, os mecanismos responsáveis pelo comportamento limite para desencadear a resposta da coagulação e o papel dos reguladores do sistema (Jesty e Beltrami, 2005).

Várias proteínas envolvidas no processo de coagulação e inibidores foram descobertos, bem como novas interacções entre esses componentes do sistema. O aumento do conhecimento sobre o processo de coagulação permitiu o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico da coagulação e a descoberta de novos fármacos anti-trombóticos e hemostáticos (Bombeli e Spahn, 2004).

Ao conhecimento clínico da coagulação, foram adicionados novos aspectos, como os principais componentes celulares que participam na coagulação, nomeadamente as plaquetas, células endoteliais, monócitos e eritrócitos, e os principais componentes moleculares que são os factores de coagulação e inibição, factores de fibrinólise, proteínas adesivas (ex: factor de von Willebrand), proteínas intercelulares, imunoglobulinas, íões cálcio, fosfolípidos, prostaglandinas e certas citocinas (Bombeli e Spahn, 2004).

O processo de coagulação, em condições fisiológicas normais, inicia-se através da via extrínseca, que é dependente de um factor tecidual, também designado por tromboplastina ou factor III (Brummel *et al.*, 2002; Butenas *et al.*, 2000).

Na fase de iniciação da coagulação, o tecido lesado liberta o factor tecidual (TF) que por sua vez se liga ao factor VIIa, que circula na corrente sanguínea em pequenas quantidades. Este complexo TF:VIIa por sua vez desencadeia a coagulação através da activação do factor IX para

IXa e o factor X para Xa. O factor Xa liga-se rapidamente ao factor II dando origem a pequenas quantidades de trombina (FIIa). Numa reacção mais lenta, o factor IXa liga-se e activa o factor X para Xa (Bombeli e Spahn, 2004).

Maioria dos processos de coagulação *in vivo* iniciam-se pelo factor tecidual, enquanto que a activação por contacto com colagénio (activação do FXII) ainda não está bem esclarecida. A seguir o processo de coagulação entra na fase de amplificação, pois as quantidades de trombina geradas ainda estão em quantidades muito pequenas para ocorrer a degradação do fibrinogénio em fibrina e portanto existem vários mecanismos de feedback positivo (Bombeli e Spahn, 2004).

A activação do complexo TF:VII pelo factor Xa é o principal mecanismo de feedback positivo do processo de coagulação. Quando o TF está disponível no plasma, este liga-se com grande afinidade tanto à forma inactiva do factor VII como à forma activa do factor VIIa. A maior parte do TF disponível liga-se à forma inactiva do FVII, dando origem ao complexo TF:VII, isto porque os níveis da forma FVIIa são baixos no plasma, cerca de 0.5% do total de FVII, resultando numa pequena proporção do complexo TF:VIIa formado, mas suficiente para activar o FX e ocorrer o processo de feedback que leva à conversão do restante complexo TF:VII para TF:VIIa (Jesty e Beltrami, 2005).

A activação do FVIII pela trombina constitui outra etapa de feedback positivo. O factor VIII é o cofactor regulador para o factor IXa, mas este circula no sangue na forma inactiva. Pelo que o FIXa não actua na cascata de coagulação enquanto o FVIII se encontrar inactivo (Jesty and Beltrami 2005). Para além disso a trombina activa o cofactor V que acelera a activação do FII (protrombina) pelo FXa e ainda o FXI para FXIa que leva ao aumento do FIXa (Bombeli e Spahn, 2004).

A seguinte etapa é chamada de propagação e é caracterizada por manter a produção de trombina, de modo a assegurar a formação suficiente do coágulo, por conversão do fibrinogénio em fibrina. Por último temos a fase da estabilização do coágulo, onde a trombina atinge níveis mais altos e que são suficientes para activar o FXIII (uma transglutaminase), que estabelece ligações covalentes entre os monómeros de fibrina solúveis para dar origem a uma malha insolúvel de fibrina estável. Nesta fase o inibidor da fibrinólise activável pela trombina (TAFI) protege o coágulo do ataque fibrinolítico (Bombeli e Spahn, 2004).

## **1.2. Estabilização do coágulo**

No final da cascata de coagulação, o factor XIIIa cria ligações covalentes entre as moléculas de fibrina, que precipita e forma o coágulo, cujas fibras estão mais resistentes à actividade

proteolítica e à disrupção mecânica. Este factor é uma transglutaminase que catalisa a ligação cruzada entre a glutamina de uma cadeia com a lisina de outra cadeia  $\gamma$  das moléculas de fibrina dentro e entre as fibras do coágulo, têm um efeito notável nas propriedades reológicas do coágulo. A presença deste factor XIII é altamente importante, uma vez que as hemorragias são frequentes em pacientes com défice ou ausência deste factor, pois as fibras de fibrina precisam de ser estabilizadas de modo a formar uma estrutura rígida e elástica capaz de impedir perdas de sangue no sistema circulatório (Standeven *et al.*, 2007).

Das três cadeias de fibrinogénio, somente a cadeia  $\alpha$  e  $\gamma$ , sofrem ligações cruzadas (*cross-linking*) pelo factor XIIIa. Durante a formação do coágulo, nas fases iniciais da polimerização, o *cross-linking* ocorre dentro das protofibras, entre as diversas cadeias, resultando na formação de dímeros  $\gamma$  e as múltiplas ligações entre as cadeias  $\alpha$ , resultam na formação de polímeros  $\alpha$  (Chen e Doolittle, 1969; McKee, Mattock e Hill, 1970).

Numa fase mais avançada da polimerização, o factor XIIIa é capaz de gerar estruturas que contém várias combinações de ligações cruzadas entre as cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$ , conferindo uma grande resistência à fibrinólise (Siebenlist e Mosesson, 1994, 1996).

Ainda não é totalmente conhecida o efeito das diferentes formações *cross-linking* no coágulo de fibrina, no entanto sabe-se que o aumento da rigidez dos coágulos sanguíneos é atribuído às ligações cruzadas entre as cadeias  $\alpha$  (Ryan *et al.*, 1999).

Um estudo recente sugere ainda que o *cross-linking* das cadeias  $\gamma$  desempenha um papel fundamental na determinação das propriedades viscoelásticas da fibrina (Collet *et al.*, 2005).

### **1.3. Fibrinólise**

A cascata fibrinolítica responde à formação da fibrina (FN) pela acção da trombina sobre o fibrinogénio. O activador do plasminogénio tecidual (t-PA), que é libertado pelo endotélio, funciona na presença da fibrina como cofactor, e catalisa a conversão de glu-plasminogénio (GPg) para glu-plasmina (GPn). A GPn por sua vez inicia a conversão da FN para a sua forma modificada FN', que apresenta uma actividade de cofactor aumentada (Nesheim, 2003).

Na ausência de FN, o t-PA activa o plasminogénio a uma taxa muito baixa. No entanto na presença de FN, tanto o t-PA como o plasminogénio ligam-se à FN, formando um complexo ternário que aumenta a eficiência catalítica do t-PA em cerca de mil vezes (Dobrovolsky e Titaeva, 2002).

A FN' também funciona como cofactor para a reacção de conversão da forma de GPg para a forma Lys-plasminogénio (LPg), que é um melhor substrato para o centro activo do t-PA. Esta reacção e a conversão da FN para FN' representa o mecanismo de feedback positivo na cascata fibrinolítica. Quando o TAFI é formado, este modifica a fibrina na forma FN' para a forma FN'', o que elimina o mecanismo de feedback positivo e atenua a fibrinólise. A cascata também é inibida por serina proteases, nomeadamente o inibidor do activador do plasminogénio tipo 1 (PAI- 1) e a antiplasmina (AP), que irreversivelmente inactivam o t-PA e a plasmina, respectivamente (Nesheim, 2003).

O processo fibrinolítico termina com a degradação das formas FN' e FN'' em uma família de produtos solúveis derivados da degradação de fibrina (FDPs). O processo de coagulação e fibrinólise apresentam várias características em comum. Ambos respondem a um activador que é libertado pelos tecidos (factor tecidual na coagulação) ou pelo endotélio (t-PA na fibrinólise), ambos procedem através da conversão de zimogénios em proteases, possuem mecanismos de feedback positivo após uma fase de iniciação e são regulados negativamente por proteases inibidoras e reacções mediadas pelo complexo trombina-trombomodulina (Nesheim, 2003).

A cascata de coagulação e fibrinolítica geralmente são abordadas como sistemas separados e independentes. No entanto, observações recentes, sugerem que ambos os sistemas estão interligados. Isto ocorre não só pela via do inibidor da fibrinólise activável pela trombina (TAFI), mas também através de reacções em que a plasmina, por exemplo, pode tanto activar e / ou desativar os factores de coagulação V e IX (Lee e Mann, 1989; Samis *et al.*, 2000).

Para além disso, a trombomodulina das células endoteliais é importante na regulação do balanço entre os dois sistemas, pois é capaz de converter a trombina em uma enzima anticoagulante, dirigindo-a para a activação da proteína C e também pode converter a trombina para uma enzima antifibrinolítica, direccionando-a para a activação do TAFI (Nesheim, 2003).

#### **1.4. Patologias associadas com a fibrinólise**

Temos patologias associadas com a deficiência no plasminogénio, que resultam de uma reduzida expressão da molécula (hipoplasminogenemia, deficiência de plasminogénio tipo I) ou de uma expressão disfuncional da molécula (displasminogenemia, deficiência de plasminogénio tipo II) (Mehta e Shapiro, 2008).

A deficiência no plasminogénio, tanto na forma homozigótica como heterozigótica, está relacionada com o aparecimento de trombose na presença de outros defeitos genéticos, tal como a mutação do factor V de Leiden (Demarmels Biasiutti *et al.*, 1998).

Deficiência severa no plasminogénio pode levar ao desenvolvimento da conjuntivite Lenhosa, uma doença ocular rara caracterizada pela formação de pseudomembranas ricas em fibrina, essencialmente na conjuntiva tarsal (Schuster e Seregard, 2003).

A alteração dos activadores do plasminogénio também parece estar associada ao aparecimento de patologias. Há relatos esporádicos de deficiência de t-PA em pacientes com trombose (Brandt, 2002). Por outro lado, a elevada expressão desses activadores, leva ao aparecimento de hemorragias anormais, mas que são condições muito raras (Booth *et al.*, 1983).

Excessiva produção do activador de plasminogénio uroquinase (u-PA), no interior dos grânulos alfa das plaquetas, está relacionada com a síndrome de Quebec, um distúrbio hemorrágico autossómico dominante extremamente raro (Diamandis *et al.*, 2009; Veljkovic *et al.*, 2009).

Vários estudos têm associado os níveis elevados de PAI -1 com a trombose venosa ou arterial, bem com o risco de choque séptico e falência múltipla dos órgãos (Raaphorst *et al.*, 2001; Sanchez Miralles *et al.*, 2002; Westendorp, Hottenga e Slagboom, 1999).

Existe ainda a deficiência da  $\alpha$ 2-antiplasmina, que resulta em um distúrbio hemorrágico congénito raro, devido a uma maior actividade da plasmina e processo fibrinolítico (Saito, 1988; Williams, 1989).

## **1.5. Terapia trombolítica**

De um modo geral, existem três opções de terapia trombolítica para os pacientes, através da administração de agentes anticoagulantes e antiplaquetários, e por fim através do uso de enzimas fibrinolíticas.

### ***1.5.1. Anticoagulantes***

Os anticoagulantes são agentes químicos capazes de prevenir ou controlar a coagulação sanguínea. A maioria deles actua bloqueando uma ou mais etapas da cascata de coagulação que culmina com a formação de fibrina. Alguns fármacos usados podem actuar também através da inibição da síntese de factores de coagulação, enquanto outros aumentam a actividade anticoagulante que ocorre naturalmente no sangue ou previnem a formação da rolha plaquetária (Odén e Fahlén, 2002).

A Varfarina é um anticoagulante que inibe a coagulação interferindo com a incorporação de vitamina K em factores de coagulação dependentes de vitamina K, incluindo os factores II, VII, IX e X. No entanto, a sua eficácia pode ser influenciada pela idade, grupo étnico, dieta e pela co-medicação, tais como os antibióticos. A heparina é outro exemplo de um anticoagulante, cujo seu efeito principal reside na inibição da trombina e dos factores IIa e Xa da cascata de coagulação. Para além disso apresenta uma meia-vida reduzida, está associada a hemorragias, osteoporose, alopecia, trombocitopenia e hipersensibilidade (Fitzmaurice, Blann e Lip, 2002).

### **1.5.2. Antiplaquetários**

Os agentes antiplaquetários são usados para prevenir a formação do coágulo ou impedir que este se torne maior, provocando a oclusão dos vasos sanguíneos. A aspirina é o fármaco antiplaquetário mais usado, e o seu modo de acção é através da inibição da agregação plaquetária. Os efeitos adversos da aspirina são muito similares ao da Varfarina. Outros fármacos antiplaquetários, como o dipiridamol, clopidogrel e a ticlopidina, actuam através da inibição do factor de activação plaquetária e do colagénio. No entanto, o seu uso está associado a condições patológicas como a supressão da medula óssea, em particular à leucopenia (Blann, Landray e Lip, 2002).

### **1.5.3. Enzimas fibrinolíticas**

A terapia enzimática é uma área com um crescente destaque na medicina, assim decorre muita investigação com o objectivo de desenvolver novas estratégias ou fármacos com maior eficácia e especificidade na terapia fibrinolítica.

Ao contrário da heparina e da varfarina, as enzimas fibrinolíticas promovem a lise dos trombos pré existentes. Consoante o modo de acção destas enzimas, estas podem ser classificadas em dois tipos, os activadores do plasminogénio (PA) e as enzimas do tipo plasmina, que degradam directamente a fibrina, o que por sua vez leva à destruição rápida e completa dos trombos (Kotb, 2013).

O grupo de enzimas activadoras do plasminogénio inclui a streptokinase, urokinase (Duffy, 2002), e o activador do plasminogénio tecidual (t-PA) alterado geneticamente (Collen e Lijnen, 2004).

Várias evidências clínicas demonstram que pacientes com tromboembolia tratados com streptokinase e urokinase apresentam uma taxa de resolução do coágulo três vezes superior a doentes tratados apenas com heparina. Estas enzimas também podem prevenir danos no organismo, pela remoção de coágulos que foram recentemente formados.

A streptokinase é um agente trombolítico eficiente de origem bacteriana (*streptococci*). Esta enzima potencia a via fibrinolítica do próprio organismo pela conversão do plasminogénio em plasmina. Sendo de origem bacteriana, esta apresenta propriedades antigénicas reconhecidas como estranhas no organismo e pode resultar no desenvolvimento de anticorpos neutralizantes e reações alérgicas. Por outro lado o t-PA produzido pela tecnologia do DNA recombinante, tem as mesmas propriedades da molécula endógena que activa o sistema fibrinolítico, e portanto não desenvolve respostas alérgicas e é considerada mais específica para a lise do coágulo (Mine, Wong e Jiang, 2005)

Estas enzimas também têm outros aspectos negativos, como a baixa especificidade dos centros activos, o que leva a efeitos adversos, nomeadamente hemorragias gastrointestinais (Turpie, Chin e Lip, 2002); fibrinogénólise sistémica acompanhada de problemas hemorrágicos também é frequentemente encontrada, bem como complicações neurais (Caramelli *et al.*, 1992) e hemorragias intracraniais (Kase *et al.*, 1992).

A eficácia limitada e os efeitos secundários indesejados destes agentes trombolíticos constituem problemas à sua aplicação clínica. Muita investigação é feita no sentido de ultrapassar esses problemas, seja pela procura do aumento da actividade trombolítica ou pela melhoria do direccionamento alvo destas proteínas sobre os coágulos. Para além disso tanto a streptokinase como a urokinase dependem e actuam pela activação do plasminogénio em plasmina (acção indirecta), o que torna importante direccionar as novas investigações para a descoberta de novos agentes que sejam capazes de actuar directamente sobre a fibrina (Caramelli *et al.*, 1992).

## **2. Fontes de enzimas fibrinolíticas**

### **2.1. Bactérias**

Existe um grande conjunto de enzimas fibrinolíticas que foram descobertas sobretudo em bactérias do género *Bacillus sp* isolados a partir de alimentos tradicionais fermentados (Peng, Yang e Zhang, 2005).

Temos a nattoquinase (NK) de *Bacillus subtilis natto*, que possui uma potente actividade fibrinolítica e a sua descoberta foi feita através de um screening de bactérias existentes em determinado tipo de alimento fermentado japonês, designado por *natto* (Sumi *et al.*, 1987). Outro estudo indica que a nattokinase também pode ser purificada a partir de

sobrenadante da cultura da estirpe TKU015 de *Pseudomonas sp.* isolada a partir do solo e que apresenta elevada actividade sobre a fibrina (Wang *et al.*, 2009).

Segundo Suzuki *et al.* (2003), uma dieta suplementar com *natto* está relacionada com o encurtamento do tempo de lise de euglobulina, que é um indicador da actividade fibrinolítica intrínseca total do plasma. Simultaneamente, esta enzima não prolonga o tempo de coagulação, indicando que esta poderá ser usada como um suplemento alimentar seguro, por não possuir efeitos secundários indesejados (Suzuki *et al.*, 2003).

Também foram encontradas outras enzimas fibrinolíticas de bactérias existentes em vários tipos de alimentos fermentados, nomeadamente a CK de soja fermentada designada por chungkook-jang (Kim *et al.*, 1996), a enzima Jeot-gal de *Bacillus sp.* KA38 encontrado em peixe fermentado coreano, jeot-gal (Kim *et al.*, 1997, p. 38).

Mais recentemente foi descoberta a Subtilisina DFE em *B. amyloliquefaciens* DC-4 de soja fermentada chinesa, designada por douchi (Peng *et al.*, 2003), bacillopeptidase DJ-2 produzida por *Bacillus sp.* DJ-2 de pasta de soja fermentada, Doen-jang (Choi *et al.*, 2005) e a subtilisina DJ-4 de *Bacillus sp.* DJ-4 em doen-jang coreano (Kim e Choi, 2000).

Segundo Yoon *et al.* (2002), também encontraram varias enzimas fibrinolíticas através de um screening em alimentos fermentados, incluído os referidos anteriormente e isolaram uma estirpe de *Enterococcus faecalis* com grande actividade fibrinolítica (Yoon *et al.*, 2002).

O *Streptococcus hemolyticus* e o *Staphylococcus aureus* produzem a streptokinase e a staphylokinase respectivamente, em que ambos são usados na terapia trombolítica (Collen e Lijnen, 1994).

Outro estudo demonstra que *Streptomyces megasporus* estirpe SD5 isolada de águas termais, produz uma enzima fibrinolítica termostável (Chitte e Dey, 2000).

As tabelas 1 e 2 apresentam um resumo das enzimas que foram descobertas e o respectivo microrganismo a partir do qual foram obtidas e purificadas.

**Tabela 1a: Bacillus de alimentos tradicionais fermentados**

Microrganismo	Alimento	Enzima	Referências
<i>B. natto</i> , NK	<i>Natto</i> , Japan	Nattokinase	(Fujita <i>et al.</i> , 1993)
<i>B. amyloliquefaciens</i> DC-4	<i>Douchi</i> , China	Subtilisina DFE	(Peng <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bacillus sp.</i> CK	Chungkook-jang, Korea	CK	(Kim <i>et al.</i> , 1996)
<i>Bacillus sp.</i> DJ-4	Doen-jang, Korea	Subtilisin DJ-4	(Kim e Choi, 2000)

Microrganismo	Alimento	Enzima	Referências
<i>Bacillus sp.</i> DJ-2	Doen-jang, Korea	bpDJ-2	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bacillus sp.</i> KA38	Jeot-gal, Korea	Jeot-gal enzyme	(Kim <i>et al.</i> , 1997)
<i>B. subtilis</i> QK02	Fermented soybean	QK-1 and QK-2	(Ko <i>et al.</i> , 2004)
<i>Bacillus firmus</i> NA-1	Natto	-	(Seo e Lee, 2004)
<i>B. subtilis</i> IMR-NK1	Natto	-	(Chang <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bacillus sp.</i>	Tofuyo, Japan	SMCE	(Fujita <i>et al.</i> , 1993)
<i>Bacillus sp.</i>	Kimchi, Korea	Bacillus protease	(Noh <i>et al.</i> , 1999)
<i>Bacillus sp.</i> KDO-13	Soybean paste, Korea	-	(Lee <i>et al.</i> , 2001)

**Tabela 2: Outras bactérias com enzimas fibrinolíticas**

Microrganismo	Referências
<i>B. subtilis</i> BK-17	(Jeong <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. subtilis</i> A1	(Jeong <i>et al.</i> , 2004)
<i>B. subtilis</i> 168	(Kho <i>et al.</i> , 2005)
<i>Actinomyces thermovulgaris</i>	(Egorov, Kochetov e Khaidarova, 1976)
<i>S. megasporus</i> SD5	(Chitte e Dey, 2000)
<i>S. spheroids</i> M8-2	(Egorov <i>et al.</i> , 1985)
<i>Streptomyces sp.</i> Y405	(Wang, Wang e Wang, 1999)

## 2.2. Outros microrganismos

Conhecem-se alguns tipos de fungos capazes de produzir proteases com elevada actividade fibrinolítica, como por exemplo, o *Penicillium chrysogenum* (el-Aassar, el-Badry e Abdel-Fattah, 1990), *Fusarium oxysporum* (Sun *et al.*, 1998), *Aspergillus ochraceus* 513 (Batomunkueva e Egorov, 2001) e *Rhizopus chinensis* 12 (Xiao-Lan *et al.*, 2005). Recentemente uma nova protease com actividade fibrinolítica, designada por Fu-P, foi isolada de *Fusarium sp.*, e o seu modo de acção é através da clivagem directa dos coágulos de fibrina (Wu *et al.*, 2009).

## 2.3. Outros organismos

Foram várias as enzimas descobertas a partir de uma grande variedade de organismos. Actividade proteolítica é muito estudada em anelídeos, onde demonstraram a presença de

actividade fibrinolítica e hemolítica em *Eisenia fétida* (Milochau, Lassegues e Valembos, 1997; Tang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Yang e Ru, 1997).

Também no estudo de Mihara *et al.* (1991), descobriram uma nova enzima fibrinolítica extraída de *Lumbricus rubellus*, denominada por lumbrokinase (Mihara *et al.*, 1991), outros ainda purificaram e caracterizaram enzimas com elevada actividade do mesmo organismo (Nakajima *et al.*, 1996; Nakajima, Mihara e Sumi, 1993) e em *L. bimastus* (Xu *et al.*, 2002).

Para além dos anelídeos, encontraram enzimas em outros organismos, tais como a scolonase da centopeia coreana, *Scolopendra subspinipes mutilans* (You *et al.*, 2004), lonofibrase de *Lonomia obliqua caterpillars* (Pinto *et al.*, 2004), venenos de serpentes (Bortoleto *et al.*, 2002; Leonardi, Gubensek e Krizaj, 2002; De-Simone *et al.*, 2005), protease NJP isolada de *Neanthes japonica* (Wang *et al.*, 2011), por fim enzimas fibrinolíticas de Louva-a-deus (Hahn *et al.*, 1999, 2001) e do cogumelo medicinal, *Cordyceps militaris* (Kim *et al.*, 2006).

Os venenos de serpentes, são conhecidos por conter muitos componentes biologicamente activos que afectam a hemostasia (White, 2005). Enzimas fibrinolíticas têm sido isoladas a partir de venenos de serpentes das famílias Viperidae, Elapidae e Crotalidae (Markland, 1998; Swenson e Markland, 2005). Sendo que a maioria das enzimas encontradas nestes venenos são metalloproteinasas.

Enzimas com actividade trombolítica também foram isoladas a partir da saliva de morcegos (Liberatore *et al.*, 2003; Schleuning, 2001), em ovos de louva-deus *Tenodera sinensis* (Hahn *et al.*, 1999), escaravelhos, *Catharsius molossus* (Ahn *et al.*, 2005) e da alga *Codiales codium* (Sumi, Nakajima e Mihara, 1992).

Outras algas marinhas, tais como, *Codium intricatum*, *Codium latum* e *Codium divaricatum*, são fontes de enzimas fibrinolíticas (Matsubara *et al.*, 1998, 1999, 2000).

Por fim, enzimas fibrinolíticas também foram identificadas em corpos de frutificação e sobrenadante de cultura de diferentes cogumelos medicinais, tais como, a aminopeptidase de *Grifora frondosa* (Nonaka *et al.*, 1997), metalloprotease de *Pleurotus ostreatus* (Choi e Shin, 1998) e *Armillaria mellea* (Kim e Kim, 1999), proteases 1 e 2 de *Fomitella fraxínea* (Lee, Bai e Park, 2006) e em *Cordyceps militaris* (Cui *et al.*, 2008).

### **3. Família das serina-proteases**

As enzimas fibrinolíticas são na sua maioria proteases. Estas catalisam reacções de hidrólise sobre proteínas e actuam especificamente no interior de ligações peptídicas. A maioria células

vivas produz diferentes tipos de proteases, mas a maior parte é produzida por microorganismos. As proteases estão subdivididas em dois grandes grupos, dependendo do seu modo de acção, são chamadas de exopeptidases ou endopeptidases. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupo amino ou carboxi terminal do substrato, enquanto as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Baseado no grupo funcional presente no centro activo das proteases, estas podem ser classificadas em quatro famílias: as serina proteases, proteases aspárticas, proteases cisteínicas e as metalloproteases. As proteases fibrinolíticas são na sua maioria serina ou metalloproteases e apresentam grande importância na indústria alimentar, farmacêutica e de manutenção residual (Kotb, 2012).

Mais de um terço de todas as enzimas proteolíticas conhecidas pertence ao grupo das serina-proteases, distribuídas por 40 famílias. As serina-proteases são caracterizadas pela presença de uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos do ácido aspártico, serina e histidina. A serina actua como um resíduo muito reactivo (nucleófilo) que forma uma ligação covalente com o substrato e depende da presença dos restantes componentes da tríade catalítica, como os resíduos de ácido aspártico (electrófilo) e histidina (base) (Cera, Di, 2009).

As proteases do tipo tripsina são as mais abundantes do grupo das serina-proteases. Elas estão presentes nos eucariotas, procariotas, nas archaea e nos vírus, e participam em variados processos fisiológicos, incluindo proteases do sistema digestivo (tripsina e quimotripsina), sistema imunológico (factores complemento B, C e D), enzimas envolvidas na coagulação (factores VIIa, IXa, Xa e XIIa), enzimas fibrinolíticas (urokinase, activador tecidual do plasminogénio e plasmina) e do sistema reprodutor (acrosina). Durante muito tempo apenas se conhecia dois grupos de serina-proteases, o grupo das proteases do tipo tripsina e o das subtilisinas, o grupo PA e SB, respectivamente. Com os avanços nos estudos da clonagem de genes e da determinação tridimensional das estruturas moleculares, descobriu-se uma variedade de outras serina peptidases que não se encaixavam nestes dois grupos. A arquitectura do sítio activo das proteases pertencentes aos grupos PA e SB são idênticos, no entanto as suas estruturas tridimensionais são diferentes, indicando que surgiram por evolução convergente. As proteases do tipo tripsina (PA) apresentam uma estrutura em barril beta com duplo enrolamento, enquanto as enzimas do tipo subtilisinas (SB) apresentam uma estrutura de folhas betas em paralelo. Mais tarde foram descobertas as peptidases do grupo SC com uma configuração  $\alpha$ , $\beta$ -hidrólase, mas que possuem a mesma tríade catalítica das serina-proteases clássicas, como a quimotripsina e a subtilisina. No entanto mais recentemente foi identificado outros grupos (SE, SF, SH, SJ, SK, SP, SR), cujo resíduos que fazem parte do sítio activo estão alterados e consequentemente o mecanismo de acção também (Polgár, 2005).

As serina-proteases podem ser inibidas por um grande grupo de inibidores classificados em 10 famílias diferentes, em função da sequência aminoacídica, do número de pontes dissulfeto, número e localização dos centros activos e pelo mecanismo de inibição (Laskowski e Kato, 1980). A família mais relevante de inibidores das serina-proteases são as designadas serpinas que não só incluem proteínas com actividade inibitória contra as serina proteases, mas também contra as cisteínas proteases, e fazem parte da maior superfamília de inibidores de proteases envolvidos em muito processos biológicos críticos, como a coagulação do sangue, fibrinólise, apoptose e nos processos inflamatórios (Khan *et al.*, 2011). As serpinas também regulam outros processos fisiológicos como: proteólise intracelular, diferenciação celular, pressão sanguínea, transporte hormonal, angiogénese, supressão tumoral, neoplasia, patogenicidade viral e parasitária (Potempa, Korzus e Travis, 1994). Outros inibidores foram identificados, como o  $\alpha$ -PI, RPI I e RPI II no soro de rato (Kuehn *et al.*, 1984); endopina 1 em músculo de bovino (Tassy *et al.*, 2005) e antitrombina III (Roemisch *et al.*, 2002). Temos também o PMSF e a Benzamidina que são inibidores de serina proteases em geral (Lundblad, 2007).

## II - Materiais e Métodos

### 1. Material Biológico

#### 1.1. Bactérias

Neste screening de actividades recorreu-se a bactérias que foram isoladas a partir do solo de diversos pontos da ilha de São Miguel, e que estão armazenados no banco de isolados da Universidade dos Açores.

No total foram seleccionados 24 isolados pertencentes ao género *Bacillus* e que apresentam actividade enzimática conhecida (**Tabela 3**).

**Tabela 3a: Isolados bacterianos seleccionados para o screening de actividades**

Isolado:	Crescimento (60°C)	Carboxymethyl cellulase	Amilases	Proteases	Lipases
S1e	-	-	++	+++	+++
S25b	+	-	+++	+++	++
S35b	-	++	+	+++	++
S54d	-	-	++	+++	++
S56b	-	+	+	+++	+++
S150d	-	-	+	+++	-
S37c	-	-	++	+++	++
S47a	-	-	+++	+++	++
S144c	-	-	+++	+++	-
S122c	-	+++	-	+++	+
S150c	-	-	+	+++	+
S53c	-	-	-	+++	+

**Tabela 3b: Isolados bacterianos seleccionados para o screening de actividades**

Isolado:	Crescimento (60°C)	Carboxymethyl cellulase	Amilases	Proteases	Lipases
S118e	-	++	+	+++	-
S127e	-	-	-	+++	-
S160a	-	-	-	+++	-
S117b	-	-	-	+++	+
S124a	-	+++	-	+++	-
S157e	-	-	-	+++	+
S159c	-	-	-	+++	++
S126e	-	-	-	+++	-
S172d	-	-	-	+++	-
S147e	-	-	++	+++	++
S191d	-	-	-	+++	+++
S192b	-	-	++	+++	+++

## **1.2. Nemátodes**

Para além dos isolados bacterianos, também foi incluído neste screening de actividades, o nematode *Steinernema Carpocapsae*, que se encontra armazenado em água a 10 °C, no Azorean Entomopathogenic Collection da Universidade dos Açores.

Este nematode habita nos solos e é muito estudado em controlo biológico, pois trata-se de um parasita capaz de infetar insetos, penetrando nestes através das partes anteriores e posteriores, e invadindo o hemocélio através da parede intestinal (Toubarro *et al.*, 2010).

## **2. Extração de proteases das bactérias**

### **2.1. Cultura das bactérias**

Cada um dos 24 isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 ml de meio líquido Luria Broth e a sua incubação foi feita durante 24 horas a uma temperatura de 30° C.

A partir dos tubos com meio LB fez-se um riscado para placas com meio de agar nutritivo sólido, que posteriormente foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 28 °C. Estas placas foram depois armazenadas a 4°C de modo a serem utilizadas em futuras inoculações e posterior obtenção do respectivo sobrenadante.

### **2.2. Obtenção do sobrenadante da cultura bacteriana**

Após inoculação e incubação dos 24 isolados em tubos de ensaio com 5 ml de meio Luria-Bertani, cada uma das culturas foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min a 4°C para obter o respectivo sobrenadante.

De forma a separar o restante conteúdo bacteriano do sobrenadante, procedeu-se à filtração do mesmo usando filtros de nitrocelulose com um cut-off de 0.2 µm. Após esta etapa as amostras foram concentradas cerca de 20x usando centricons de 10.000 NMWL.

## **3. Extração de proteases do nemátode**

### **3.1. Indução do estado parasitário**

Nesta etapa procedeu-se à indução do nematode *Steinernema carpocapsae* com hemolinfa de *Galleria mellonella*. Os nematodes foram submetidos a uma solução de javel para remover a cutícula, onde posteriormente foram lavados com solução de NaCl 0,8% e colocados

em 25 ml de meio de tyrod + 2 ml de hemolinfa + 25 µl de ampicilina por caixa. Passado o período de indução (18 horas) procedeu-se à lavagem com NaCl 0,8% até à remoção completa dos resíduos de hemolinfa.

### **3.2. Obtenção do ESP (excreted/secreted products)**

Para a obtenção do excretado/secretado rico em proteases, os nemátodos que foram induzidos com hemolinfa, foram colocados novamente em solução de tyrod por um período de 6 horas. Findo este tempo, separou-se o ESP dos nematodes através de um filtro de nitrocelulose com um cut-off de 0.2 µm. Após esta etapa, o ESP do nematode foi concentrado cerca de 60x usando centríficos de 10.000 NMWL.

## **4. Confirmação da actividade proteolítica**

### **4.1. Ensaio com Azoalbumina 2%**

Neste ensaio testou-se a actividade proteolítica do sobrenadante usando o substrato generalista Azoalbumina. O ensaio foi realizado a diferentes gamas de pH, para isso usou-se soluções tampão com pH 5, 7.5 e 10. Para cada gama de pH pipetou-se para um eppendorf, 100 µl de solução tampão, 100 µl de amostra sobrenadante e 200 µl de azoalbumina a 2%. Foi feito um controlo negativo para cada ensaio com 100 uL de solução tampão, 100 µl de H<sub>2</sub>O e 200 µl de azoalbumina a 2 %.

De seguida as amostras foram colocadas a incubar durante duas horas, com uma temperatura de 37°C. Findo esse tempo adicionou-se 100 µl de ácido tricloroacético (TCA 100%) em cada eppendorf de modo a fazer parar a reacção e as amostras foram homogeneizadas e colocadas no gelo durante 15 minutos. Depois fez-se uma centrifugação durante 5 minutos e pipetou-se 100 µl de sobrenadante de cada eppendorf para a microplaca. Por fim, adicionou-se 25 µl de solução NaOH a 10 M para cada poço e fez-se a leitura no leitor de microplacas (450 nm).

### **4.2. Ensaio em placa de caseína 1%**

Preparou-se 3 x 250 ml de meio agar 0,8% com três gamas pH diferentes, sendo que no meio com pH 5.8, adicionou-se 1,75 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g de agarose, 20 ml de leite magro (Skim

milk powder 125 mg/ml) e 250 µl de cloreto de cálcio a 1 molar, tudo para 230 ml de H<sub>2</sub>O. O meio com pH neutro, levou os mesmos constituintes, excepto nos sais, onde foi adicionado 1,75g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,75 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. No caso do meio com pH 8.8, foi adicionado, para além dos outros constituintes, 1,75 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. O meio não foi esterilizado na autoclave de modo a evitar o seu escurecimento devido à reação de Maillard. Apenas foi pasteurizado durante 10 minutos.

Verteu-se o meio a uma temperatura de 60 °C para placas de petri, obtendo um meio sólido com uma espessura ligeiramente superior ao normal (aproximadamente 5 mm). Após a solidificação do meio, marcou-se de forma distribuída pontos ao longo de toda placa para posterior criação dos poços onde foram carregadas as amostras de sobrenadante. Foi usada uma pipeta de Pasteur pré-aquecida para formar os poços, onde posteriormente pipetou-se 5 µl de agarose 0,8%, de modo a tapar o fundo de cada um dos poços.

As amostras de sobrenadante foram concentradas em 20x. Centrifugou-se 5 ml de amostra em tubos de falcon com membrana (Centricons com cut-off de 10 kDa) a 5000 rpm durante 15 min, onde obteve-se aproximadamente 250 µl de concentrado. Os poços do meio de caseína foram carregados com 50 µl de amostra concentrada e a incubação foi feita em uma estufa de 37 °C durante 24 horas.

## **5. Preparação de placas para fibrinólise**

### **5.1. Screening em placa de fibrina**

O screening de actividade fibrinolítica foi determinado segundo o método de Astrup e Mullertz 1952, que consiste em uma placa de fibrina com ou sem plasminogénio, mas com algumas modificações no protocolo (Astrup e Müllertz, 1952). A placa de fibrina sem plasminogénio resultou da mistura de três soluções diferentes, 7,5 ml de solução de fibrinogénio (56,25 mg de fibrinogénio com 7.5 ml de tampão Tris-HCl a 25 mM e NaCl a 75 mM), 100 µl de solução de trombina (100 U/ml) e 7,5 ml de Agarose 1,2% a uma temperatura de 50°C.

Em paralelo preparou-se outra placa de fibrina mas com plasminogénio incorporado na mistura, que foi obtido de modo semelhante, mas com a adição de 150 µl de solução de plasminogénio (6 U/ml).

Verteu-se ambas as misturas em placas de petri com 8.5 centímetros de diâmetro e deixou-se repousar durante 1 hora à temperatura ambiente de modo a que se forme toda a fibrina e o meio solidifique com o arrefecimento. Foi usada uma pipeta de Pasteur pré-aquecida para formar os poços, onde posteriormente pipetou-se 5 µl de agarose 0,8% para tapar o fundo de

cada um dos poços. Adicionou-se 20 µl de amostra sobrenadante bacteriano e do ESP de nemátodo, concentradas previamente, a cada um dos poços das placas de fibrina. Como controlo positivo foi usado 20 µl de solução urokinase (10 U/µl). O período de incubação do ensaio foi de 18 horas e a temperatura de 37°C. A actividade fibrinolítica foi estimada pela presença ou ausência de halos de digestão ao redor de cada um dos poços onde as amostras foram aplicadas.

## **6. Extracção de DNA, identificação molecular por PCR-ARDRA e sequenciação**

De modo a obter os diferentes perfis de restrição, procedeu-se à extração de DNA e amplificação por PCR do gene 16S rRNA dos 24 isolados.

Para a extração do DNA, inoculou-se uma colónia de cada um dos isolados em 5 ml de meio LB e foi a incubar a 30° C durante 18 horas. De modo a obter o pellet bacteriano, centrifugou-se 1,5 ml de meio de cultura em eppendorfs a 6000 r.p.m durante cinco minutos e descartou-se o sobrenadante. O pellet de seguida foi resuspendido em 500 µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q e submetido a 100°C durante dez minutos. De seguida as amostras foram colocadas em gelo durante outros 10 minutos. Por fim centrifugou-se a 15000 r.p.m durante cinco minutos e recuperou-se o sobrenadante que foi armazenado a -80°C até ser usado posteriormente na amplificação por PCR dos fragmentos de interesse.

Na mistura de reacção de PCR para cada isolado, utilizou-se 20.8 µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q, 2.5 µl de solução tampão 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, e 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de dNTPs a 10mM, 0.25 µl de cada um dos *primers forward* e *reverse* (tabela 4), 0.25 µl de Taq DNA polimerase (Bioline) e por fim 0.5 µl de DNA. As condições de reacção para amplificação do gene 16s rRNA foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante três minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação durante trinta segundos a 95°C, annealing durante trinta segundos a 46°C, extensão durante um minuto a 72°C e extensão final durante 2 minutos a 72°C. Finalizando a reacção de PCR a 4°C.

De seguida os fragmentos amplificados foram analisados utilizando uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% e o número de pares de bases foi estimado de acordo com o marcador molecular que consiste em 10 fragmentos que variam entre os 100 bp e 1000 bp (BIORON GmbH).

**Tabela 4: Primers desenhados segundo Wu *et al.*, 2006. O *primer forward* (B-K1/F) corresponde à posição de nucleótidos 255-273 do 16s rRNA na estirpe de referência *E. coli* e o *reverse* (B-K1/R1) corresponde à posição 1350-1367.**

Gene	Primers
16S rRNA	B-K1/F, 5'-TCACCAAGGCRACGATGCG-3' B-K1/R1, 5'-CGTATTACCCGCGGCATG-3'

A seguinte etapa foi a digestão de cada um dos produtos amplificados com a enzima de restrição AluI (AG'CT). Juntou-se 5 µl de produto amplificado com 5 U de enzima de restrição em 20 µl de volume total. A reacção de digestão enzimática decorreu durante 4 horas a uma temperatura de 37°C. Os fragmentos de restrição foram subtidos a uma corrida eletroforética juntamente com o marcador de DNA (100 a 1000 bp) em gel de agarose a 2% e as bandas foram reveladas com brometo de etídio.

Depois outra parte do produto amplificado do gene 16s rRNA do isolado S127e, que foi seleccionado por ter registado maior actividade fibrinolítica, foi purificada com um kit de purificação de PCR ( *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega*) e de seguida a amostra foi enviada para sequenciar o DNA.

## 7. Análise da sequência do isolado S127e

Após ter-se obtido as sequências *forward* e *reverse* do gene amplificado 16s rRNA do isolado S127e, estimou-se a sequência consensus através do programa BioEdit. Para isso seleccionou-se as sequências *reverse* e converteu-se, através da opção “*Reverse Complement*” do programa, em sequências *forward*, ou seja, inverteu-se a sequência *reverse* de maneira a alinhar com as restantes sequências *forward* obtidas. Após o alinhamento de todas as sequências, foi possível achar a sequência consensus através do programa.

Usando a ferramenta de alinhamento Nucleotide Blast do NCBI ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) foi possível ver a homologia com sequências conhecidas da base de dados e a percentagem de identidade com outras espécies de bactérias foi também determinada com este programa.

## 8. Zimograma com fibrina

O sobrenadante total de cada uma das amostras com actividade fibrinolítica detectada foi separado em SDS-PAGE suplementado com fibrina. O zimograma foi realizado em gel com 12% de acrilamida/bisacrilamida em 1.5 M de solução tampão Tris-HCl (pH 8.8) copolimerizado com fibrinogénio a 0.12% em 20 mM de solução tampão fosfato e 100 µl de trombina (10 U/µl). Após a corrida electroforética num sistema designado por *Mini-protean II Cell* (Bio-Rad), o gel foi lavado três vezes durante 30 minutos em solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, contendo 2.5% de Triton X-100 e posteriormente removeu-se o Triton com água destilada em 3 lavagens de 10 minutos.

De seguida o gel foi incubado por mais 4 horas em solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, contendo 1 mM de cloreto de cálcio e cloreto de magnésio. As zonas em que ocorreu actividade proteolítica foram detetadas através da coloração azul de Coomassie. As amostras (20 µl) foram carregadas no gel com 10 µl de solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7, e 10 µl de tampão de amostra. Usou-se a 10 µl de urokinase como controlo positivo diluído em 5 µl de solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7, e 5 µl de tampão de amostra.

## 9. Fraccionamento por cromatografia

Todas as separações cromatográficas foram realizadas num sistema de *Fast Protein Liquid chromatography* (FPLC da GE Healthcare Life Sciences) a 5°C. Foi necessário obter maior quantidade de sobrenadante do meio de cultura da bactéria produtora da enzima fibrinolítica de interesse para purificação. Obteve-se 1 litro de sobrenadante da cultura bacteriana conforme descrito no ponto (2.2) de Materiais e Métodos. Numa fase inicial o fracionamento envolveu uma cromatografia de troca aniónica usando uma coluna designada por HiTrapQ de 1 ml (GE), que foi equilibrada com tampão de corrida 50mM Tris-HCl, pH 8,0 (Solução Tampão A), a um fluxo de 1 ml por minuto. A amostra do sobrenadante concentrado foi previamente dialisada com tampão de corrida em Centricons (Millipore) e injectada num volume de 1 ml na coluna. As proteínas nesta etapa foram eluídas com 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 com 1M NaCl (Solução tampão B) num fluxo de 0.7 ml por minuto. A eluição foi feita com diferentes gradientes lineares (%B) obtidos pelo incremento do tampão de eluição, 0%, 10%, 30%, 60% e 100%. As proteínas eluídas foram medidas por um detetor a um comprimento de onda de 280 nm e recolhidas através de um coletor automático, que estão ambos acoplados ao

sistema de cromatografia. Para cada fracção obtida determinou-se a actividade enzimática com o substrato cromogénico N-succinyl-Ala-Ala-Pro-phe-pNA (Ref da Sigma: S-7388) específico para quimotripsinas. Juntou-se as fracções que apresentaram maior actividade e que correspondiam ao pico que saiu na exclusão, ou seja, antes do incremento do gradiente salino.

A amostra foi de seguida aplicada numa cromatografia de separação por tamanho molecular, designada por Gel Filtration, usando uma coluna de Superdex-75 equilibrada com tampão 50mM Tris-HCl, pH 8.0. Em cada Gel Filtration (FG), foi aplicada um volume de 260 µl de amostra, e as proteínas foram eluídas num fluxo contínuo de 50mM Tris-HCl a 0.5 ml por minuto. As proteínas eluídas foram recolhidas em tubos de eppendorf através de um coletor automático acoplado e para cada uma das fracções correspondentes aos respetivos picos de separação molecular foi determinada a actividade com o substrato cromogénico. Numa das etapas do fracionamento como se realizou mais que uma FG, juntou-se as fracções obtidas entre cada uma das cromatografias que eram homólogas e que registaram a maior actividade correspondente a dois picos não resolvidos ou misturados.

No total após FG, foi obtido duas fracções que foram posteriormente submetidas separadamente a uma cromatografia de troca catiónica usando uma coluna designada por HiTrapS de 1 ml (GE) e que foi equilibrada com tampão de corrida 50mM fosfato (PB), pH 6.0, a um fluxo de 1 ml por minuto. Cada amostra foi previamente dialisada com tampão de corrida a pH 6.0 em Centricons (Millipore) e injectada num volume de 800 µl na coluna. As proteínas nesta etapa foram eluídas com 50 mM PBS, pH 6.0, com 1M NaCl num fluxo de 0.7 ml por minuto. A eluição incluiu uma fase de exclusão, uma fase com incremento de gradiente salino de forma gradual até aos 30% de tampão salino (%B) e por fim um gradiente linear máximo de 100%. As proteínas eluídas foram recolhidas em tubos de eppendorf através de um coletor automático acoplado e recolheu-se as fracções que apresentaram actividade máxima correspondente a um único pico de proteína, obtendo cerca de 1,4 ml volume final de proteína purificada.

Por forma a obter uma melhor purificação da proteína, procedeu-se novamente a uma cromatografia de troca catiónica, mas de elevada força iónica, em que foi usada uma coluna MonoS de 1 ml (GE) equilibrada com tampão de corrida 50mM fosfato, pH 6.0, a um fluxo de 1 ml por minuto. A eluição das proteínas incluiu uma fase de exclusão, uma fase com incremento de gradiente salino de forma gradual até aos 40% (%B) e por fim um gradiente linear máximo de 100%. Esta MonoS permite uma maior resolução dos picos, de modo a ser possível recolher a fracção correspondente a um único pico de proteína pura.

## 10. SDS-PAGE

Realizou-se uma separação eletroforética das proteínas por SDS-PAGE das frações com actividade que foram obtidas em cada etapa do fracionamento, de modo a averiguar a crescente purificação que foi obtida ao longo das várias etapas cromatográficas pela análise do padrão de bandas obtido. Para esta análise eletroforética foi utilizado um sistema de eletroforese vertical *Mini-protean II Cell* (Bio-Rad). Fez-se um gel de separação a 12% pela adição de 4 ml de acrilamida a 30 %, 2.5 ml de solução tampão 0.375 M Tris-HCl, pH 8, e 0.1 ml de SDS a 10%, perfazendo o volume com água MilliQ até um total de 10 ml.

Foi adicionado ao gel 75 µl de APS a 10% e 30 µl de TEMED e posteriormente verteu-se o mesmo para a cassette de eletroforese, cobrindo a sua superfície durante a polimerização com butanol saturado, de modo a nivelar a superfície do gel. Após a sua polimerização, foi retirado o butanol e lavou-se com água MilliQ. Depois preparou-se o gel de concentração com acrilamida a 5% de concentração final, verteu-se sobre o gel de corrida e colocou-se o pente para a criação dos poços durante a sua polimerização. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra e a corrida eletroforética ocorreu durante 90 minutos a 100 volts.

A separação das proteínas no gel foi revelada com coloração Azul Coomassie. Para isso, o gel foi fixado numa solução de 40% metanol, 10% de ácido acético, 40% de água destilada durante 30 minutos e seguidamente foi corado com 0.25% de azul Coomassie R-250, durante 4 horas. Por fim, o gel foi descorado numa solução com 5% de metanol, 10% de ácido acético e 75% de água destilada para se visualizar o perfil de bandas proteicas.

## 11. Análise de espectrometria de massa (Ms/Ms) da proteína

Após a separação das fracções proteicas, correspondentes às diferentes etapas de purificação, em gel SDS-PAGE, as bandas correspondentes à fracção pura foram recortadas a partir do gel e colocadas em tubos de eppendorfs recobertos com água mili-Q. As amostras foram enviadas para o Grupo de Espetrometria de Massa do Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB, Oeiras) para serem analisadas. As massas monoisotópicas das proteínas analisadas foram obtidas utilizando um MALDI-TOF-MS modelo Voyager-DE-STR (Applied Biosystems). A calibração externa das massas foi realizada utilizando uma mistura de padrões de peptídeos, PepMix1 (Laserbio Labs). As massas obtidas foram utilizadas para pesquisar no banco de dados NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) usando a versão pública do software Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

## 12. Caracterização Bioquímica da enzima

### 12.1. Efeito do pH, temperatura, iões/solventes e inibidores

Para a determinação do pH ótimo da enzima, usou-se o substrato generalista azoalbumina. Este ensaio foi realizado a diferentes gamas de pH, o que envolveu o uso de diferentes soluções tampão com pH 5, 6, 7.4, 8 e 8.8. Para cada gama de pH, adicionou-se para um eppendorf, 40 µl de solução tampão, 10 µl de fração enzimática e 50 µl de azoalbumina a 2%. Foi feito um controlo negativo para cada gama de pH com 50 µl de solução tampão correspondente e 50 µl de azoalbumina a 2%.

O efeito da temperatura na actividade enzimática também foi determinado através da azoalbumina. O ensaio foi realizado a diferentes temperaturas, 16 °C, 28 °C, 37 °C, 48 °C e 60 °C. Para cada temperatura preparou-se um eppendorf com 40 µl de solução tampão, 10 µl de fração enzimática e 50 µl de azoalbumina a 2%. Foi feito um controlo negativo para cada temperatura, onde apenas adicionou-se solução tampão e substrato.

No ensaio com azoalbumina em que se pretendeu determinar o efeito dos diversos iões e solventes sobre a actividade enzimática, adicionou-se num eppendorf, 5 µl de iões/solvente a 0.1 M, 10 µl de fração enzimática, 35 µl de solução tampão e 50 µl de azoalbumina a 2%. Neste caso foi feito um controlo positivo, onde se usou amostra sem iões e um controlo negativo com solução tampão. Ambos os controlos foram incubados com o substrato. Os iões e solventes usados foram o CuSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl, Ureia, Chaps, triton, tween 20 e β-Mercaptoethanol.

Por fim também determinou-se o efeito de diversos inibidores de proteases sobre a actividade enzimática. Para cada inibidor, adicionou-se num eppendorf, 30 µl de solução tampão, 15 µl de fração enzimática e 5 µl de inibidor. A mistura foi pré-incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos e depois foi adicionado 50 µl de azoalbumina a 2%. Os inibidores usados foram a benzamidina, STI (inibidor de tripsina de soja), E64, fenantrolina, PMSF, fosforamidon, cisteína a, EDTA, leupeptina, chimostatina, TPCK e antitrombina.

De seguida todas as amostras foram colocadas a incubar durante uma hora a uma temperatura de 37°C. Findo esse tempo adicionou-se 50 µl de ácido tricloroacético (TCA 100%) em cada eppendorf de modo a fazer parar a reacção e as amostras foram homogeneizadas e colocadas no gelo durante 15 minutos. Depois fez-se uma centrifugação durante 5 minutos e pipetou-se 100 µl de sobrenadante de cada eppendorf para a microplaca. Por fim, adicionou-se

25 µl de solução NaOH a 10 M para cada poço e fez-se a leitura da absorvância no leitor de microplacas a um comprimento de onda de 450 nm.

## **12.2. Substratos específicos**

Para além da determinação dos inibidores da enzima, também foi feito um ensaio enzimático com 12 substratos específicos diferentes. Estes substratos compreendem uma pequena sequencia de aminoácidos, com um determinado local de clivagem, e que está acoplado a um grupo cromóforo designado por p-nitroaniline (pNA). Quando o substrato é hidrolisado, dá-se a libertação do grupo cromóforo, emitindo uma cor amarela.

Neste ensaio, pipetou-se para a microplaca 10 µl de enzima, 40 µl de solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, e por último 5 µl de substrato. No total foram incluídos 12 substratos específicos, cuja a sequencia aminoacídica de cada um corresponde a Pro, Met, Arg, Ala-Ala-Ala, Ala-Ala-Phe, Ala-Ala-Pro-Met, Ala-Ala-Pro-Phe, Phe-Val-Arg, Pro-Phe-Arg, Gly-Gly-Arg, Gly-Gly-Phe e Gly-Gly-Leu.

Fez-se a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 420 nm e em intervalos de 1 minuto. O tempo total do ensaio foi de 14 minutos.

## **13. Actividade fibrinolítica**

### **13.1. Aplicação das amostras em placa de fibrina**

A actividade fibrinolítica da fração pura da enzima foi determinada segundo o método de Astrup e Mullertz 1952, que consiste em uma placa de fibrina com ou sem plasminogénio, mas com algumas modificações no protocolo (Astrup e Müllertz, 1952), como já foi descrito anteriormente no capítulo do screening de atividades.

Foi aplicado na placa de fibrina várias diluições da fração enzimática pura como da urokinase comercial em paralelo. As diluições foram feitas de modo a que as concentrações da enzima e da urokinase fossem muito próximas, sendo esta uma condição necessária para ser possível comparar e estimar actividades. Para ambas as enzimas fez-se quatro diluições diferentes. A solução stock da urokinase com uma concentração de 2,532 µg/µl, foi diluída em

10x, 100x, 1000x e 10000x, enquanto que a fração pura da enzima com uma concentração de 4,589 µg/µl, foi diluída em 20x, 200x, 2000x e 20000x.

Foi usada uma pipeta de Pasteur pré-aquecida para formar os poços em duas linhas paralelas, onde posteriormente pipetou-se 5 µl de agarose 0,8% para tapar o fundo de cada um dos poços. Adicionou-se 20 µl de cada diluição da fração enzimática e da urokinase comercial, a cada um dos poços da placa de fibrina. O ensaio compreendeu um período de incubação total de 3 horas, mas foi feita a digitalização da placa de fibrina através de um scanner a cada 1 hora de período de incubação realizado a uma temperatura de 37°C. A actividade fibrinolítica foi estimada pela presença ou ausência de halos de digestão ao redor de cada poço onde a amostra foi aplicada.

Também mediu-se o raio dos halos de digestão ao longo do período de incubação e determinou-se a constante de actividade que relaciona o raio do halo com o tempo de difusão da enzima na placa de fibrina ( $\frac{R}{\sqrt{t}}$ ). Esta constante de actividade foi obtida através da simplificação de um modelo matemático que se baseia na lei de Fick que descreve diversos casos de difusão de matéria ou energia em um meio no qual inicialmente não existe equilíbrio químico ou térmico (Wang *et al.*, 2012).

A constante de actividade foi calculada para ambas as enzimas, o que permitiu estimar as unidades de actividade da enzima de interesse a partir da actividade conhecida da urokinase comercial.

### **13.2. Aplicação das amostras com plasminogénio na placa de fibrina**

Para a realização deste ensaio preparou-se mais uma placa de fibrina e fez-se quatro poços no agar com a ajuda de uma pipeta de Pasteur pré-aquecida, onde posteriormente pipetou-se 5 µl de agarose 0,8% para tapar o fundo de cada poço. No total foi preparado quatro amostras distintas.

A amostra de urokinase com plasminogénio foi preparada com a adição de 0.5 µl de urokinase (0.142 µg/µl) e 3 µl de solução de plasminogénio (0.837 µg/µl) para um eppendorf com 26.5 µl de solução tampão 50 mM Tris-HCl. No caso da fração enzimática pura com plasminogénio, adicionou-se 0.5 µl de enzima (0.144 µg/µl) e 3 µl de solução de plasminogénio (0.837 µg/µl) para um tubo de eppendorf com 26.5 µl de solução tampão. Uma terceira amostra consistiu numa diluição de 3 µl de plasminogénio (0.837 µg/µl) para 27 µl de solução tampão e a última amostra consistiu em uma diluição de 0.5 µl de amostra enzimática pura com 29.5 µl de solução tampão.

As amostras que continham plasminogénio foram incubadas a uma temperatura de 37°C durante 5 minutos antes de serem aplicadas na placa de fibrina. Posteriormente, pipetou-se 30 µl de cada amostra preparada para os respectivos poços da placa de fibrina. O ensaio compreendeu um período de incubação total de 17 horas, mas foi feita a digitalização da placa de fibrina através de um scanner a cada 1 hora de período de incubação realizado a uma temperatura de 37°C. A actividade fibrinolítica foi estimada pela presença ou ausência de halos de digestão ao redor de cada poço onde a amostra foi aplicada.

#### **14. SDS-PAGE fibrinogenolítico**

A actividade fibrinogenolítica da enzima purificada foi determinada segundo o método de Salazar et al. (2007), que consiste na pré-incubação das amostras com o fibrinogénio e obtenção de um perfil de degradação das várias cadeias do fibrinogénio ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) através de uma separação eletroforética por SDS-PAGE, com algumas modificações no protocolo (Salazar et al., 2007).

Fibrinogénio (Fg) dissolvido em solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, foi incubado com a enzima numa proporção de 300:1 a 37 °C e incubado a diferentes intervalos de tempo. Para a obtenção da solução Fg:enzima, fez-se uma mistura de 25 µl de solução de fibrinogénio (12 µg/ µl) com 7 µl de enzima (0.144 µg/ µl) e 18 µl de solução tampão 50 mM Tris-HCl, obtendo um total de 50 µl. A concentração final de fibrinogénio e de enzima obtida na solução foi de 6 µg/ µl e 0.02 µg/µl respetivamente.

Ao final de cada período de incubação, 7 µl da solução de incubação foi misturada com 2 µl de solução desnaturante (2% DTT e 2% de SDS). Para a análise do perfil de degradação das cadeias do fibrinogénio, as amostras foram aplicadas em um gel SDS-PAGE a 12%, usando um sistema de eletroforese vertical *Mini-protean II Cell* (Bio-Rad). Para a obtenção deste gel adicionou-se 4 ml de acrilamida a 30 %, 2.5 ml de solução tampão 0.375 M Tris-HCl, pH 8, e 0.1 ml de SDS a 10%, perfazendo o volume com água MilliQ até um total de 10 ml.

Foi adicionado ao gel 75 µl de APS a 10% e 30 µl de TEMED e posteriormente verteu-se o mesmo para a cassette de eletroforese, cobrindo a sua superfície durante a polimerização com butanol saturado, de modo a nivelar a superfície do gel. Após a sua polimerização, foi retirado o butanol e lavou-se com água MilliQ. Depois preparou-se o gel de concentração com acrilamida a 5% de concentração final, verteu-se sobre o gel de corrida e colocou-se o pente para a criação dos poços durante a sua polimerização. As amostras foram aplicadas a cada um dos poços pela ordem do tempo de incubação e para além disso usou-se um controlo negativo

(solução fibrinogénio sem enzima) e a corrida eletroforética ocorreu durante 90 minutos a 100 volts.

A separação das proteínas no gel foi revelada com coloração Azul Coomassie. Para isso, o gel foi fixado numa solução de 40% metanol, 10% de ácido acético, 40% de água destilada durante 30 minutos e seguidamente foi corado com 0.25% de azul Coomassie R-250, durante 4 horas. Por fim, o gel foi descorado numa solução com 5% de metanol, 10% de ácido acético e 75% de água destilada para se visualizar o perfil de bandas proteicas.

## **15. Actividade Trombolítica *in vitro***

Este ensaio pretende determinar a atividade trombolítica *in vitro*, ou seja, a capacidade da enzima em degradar ou lisar coágulos sanguíneos. Este protocolo foi baseado segundo o método de Yuan *et al.*, 2012, com algumas modificações e adaptado à microplaca para uma melhor análise do ensaio (Yuan *et al.*, 2012).

Foi obtido, através do consentimento informado, sangue fresco sem agente anticoagulante de análises clínicas fornecido pelo Hospital do Divino Espírito Santo. As amostras de sangue encontravam-se coaguladas dentro dos tubos de colheita. Procedeu-se ao corte de pequenos fragmentos de coágulos sanguíneos, todos com tamanho ou peso muito idênticos, ou seja, todos eles com aproximadamente 10 mg.

De seguida os fragmentos foram colocados em poços da microplaca e lavados com 0.1 M solução tampão fosfato salino pH 7 e 0.9% NaCl, de modo a remover as hemácias que se destacaram do coágulo. O ensaio envolveu três fragmentos de coágulos, um para o controlo negativo, outro para ver o efeito da enzima fibrinolítica e um terceiro para a urokinase, cuja a sua atividade trombolítica é conhecida. O ensaio foi feito com repetibilidade para assegurar a fiabilidade dos resultados.

Foi adicionado 80 µl de 0.1M solução tampão fosfato salino no poço do controlo negativo, 80 µl de solução enzimática urokinase com uma concentração de 2,532 µg/µl como controlo positivo e no caso do poço com a amostra enzimática a testar atividade, adicionou-se 40 µl de solução tampão fosfato salino e 40 µl de fração pura da enzima com uma concentração de 4,589 µg/µl.

De seguida a microplaca foi a incubar para a estufa a 37.°C durante 50 minutos. A cada intervalo de 10 minutos, fez-se uma digitalização da microplaca para registar o tamanho dos fragmentos em cada situação e de seguida procedeu-se à leitura da absorvância de alíquotas retiradas de cada mistura individualmente a um comprimento de onda de 550 nm.

## **16. Influência/acção da enzima no tempo de coagulação**

Recorreu-se ao ensaio do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) para avaliar a influência ou o efeito da enzima sobre o tempo de coagulação. Neste método utiliza-se o reagente de coagulação (TTPa) que contém um fosfolípido cefalina e o ácido elágico que é um ativador por contato. Uma vez que o plasma utilizado é pobre em plaquetas e conseqüentemente não dispõe do lípido plaquetário, nem de ativador de contato e cálcio que foi removido pelo uso do anticoagulante citrato de sódio que tem ação quelante, é necessária a adição de reagente TTPa (cefalina + ácido elágico) a um plasma normal citratado de modo a que ocorra ativação do fator XII, o qual por clivagem ativará o fator XI. A partir daí para que ocorra a cascata de coagulação é necessária a adição de cloreto de cálcio que vai ativar os restantes fatores.

Neste método, o tempo que leva até a formação do coágulo de fibrina após a adição do cloreto de cálcio é medido em segundos e representa o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Realizou-se este ensaio em três situações diferentes de forma automática utilizando um coagulômetro com metodologia aprovada para testes de coagulação no Laboratório de análises Clínicas da Dra. Teresa Sampaio, no qual se baseia no movimento de esferas magnéticas o que permite calcular o tempo de coagulação do plasma.

As amostras de sangue fresco com 3,8% de citrato de sódio foram previamente obtidas pela clínica e o plasma foi preparado por centrifugação do sangue a 2000 g durante 15 minutos a uma temperatura de 4° C. As amostras de plasma foram armazenadas a frio até serem usadas no ensaio.

Antes do início do ensaio fez-se um pré-aquecimento do reagente TTPa, do plasma sanguíneo e da solução de cloreto de cálcio (0.02M) a 37°C durante 3 minutos. Na primeira situação adicionou-se 50 µl de plasma e 50 µl de reagente TTPa para a cuvete (com esfera magnética) pré-aquecida no coagulômetro por 3 minutos. Adicionou-se 50 µl de cloreto de cálcio a 0.02 M à mistura na cuvete e o tempo de coagulação foi medido em segundos pelo coagulômetro até à paragem do movimento da esfera magnética. Após a formação do coágulo de fibrina adicionou-se 10 µl de solução de enzima pura com uma concentração de 4,589 µg/µl e fez-se uma avaliação visual do coágulo ao longo do tempo.

Na segunda situação adicionou-se 45 µl de plasma, 10 µl de solução enzimática e 50 µl de reagente TTPa para a cuvete com a esfera magnética. Adicionou-se 50 µl de cloreto de cálcio a 0.02 M à mistura na cuvete e o tempo de coagulação foi medido em segundos pelo coagulômetro até à paragem do movimento da esfera magnética.

Na terceira situação adicionou-se 95 µl de plasma e 10 µl de solução enzimática para a cuvete com a esfera magnética. Por fim adicionou-se 50 µl de cloreto de cálcio a 0.02 M à mistura na cuvete e o tempo de coagulação foi medido em segundos pelo coagulômetro até à paragem do movimento da esfera magnética.

## **17. Tempo de lise da Euglobulina**

Este ensaio que permite estudar o efeito/ação da enzima sobre o tempo de lise da euglobulina foi baseado segundo o método descrito por Couto *et al*, 2004 e envolve a preparação da fração de euglobulina a partir de plasma sanguíneo humano que é posteriormente analisada ao longo do tempo em microplaca através da leitura de absorvância a 405 nm (Couto, Donato e Nucci, de, 2004).

As amostras de sangue fresco com 3,8% de citrato de sódio foram obtidas através da unidade de análises clínicas do Hospital do Divino Espírito Santo e o plasma foi preparado pela centrifugação do sangue a 2000 g durante 15 minutos a uma temperatura de 4° C. As amostras de plasma foram armazenadas a -70° C até serem usadas no ensaio.

Para a obtenção da fração de euglobulina, procedeu-se a uma diluição em 10x do plasma e posteriormente fez-se a acidificação com ácido acético a pH 5.0. Num tubo de falcon de 15 ml, adicionou-se 3.6 ml de H<sub>2</sub>O, 300 µl de ácido acético (0.25%) e por fim 400 µl de plasma sanguíneo. De modo a permitir a precipitação da euglobulina, deixou-se repousar durante 1 h em gelo e de seguida foi centrifugado a 2000 g durante 15 minutos.

O sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos sobre papel durante 1 minuto. O precipitado foi resuspendido pela adição de 500 µl de 0.1 M solução de borato de sódio a pH 9.0. Os tubos foram homogeneizados no vortex durante 1 minuto.

O ensaio foi preparado em microplaca para posterior leitura da absorvância. No primeiro poço (controlo positivo), adicionou-se 10 µl de trombina e 30 µl de solução 0.1 M Tris-HCl. No segundo poço adicionou-se 10 µl de trombina, 10 µl de solução 0.1 M Tris-HCl e 20 µl de fração pura de enzima com uma concentração de 4,589 µg/µl. O terceiro poço foi como o segundo, mas a enzima foi adicionada aos 18 minutos após o início do ensaio. O quarto poço foi o controlo negativo e apenas adicionou-se 40 µl de solução tampão Tris-HCl.

A formação do coágulo foi iniciada pela adição de 150 µl de fração de euglobulina a cada um dos poços. A turbidez nos poços foi medida pela leitura da absorvância a 405 nm num leitor de microplacas a cada 3 minutos durante 7 horas.

## 18. Ensaio de citotoxicidade

### 18.1. Ensaio de citotoxicidade MTT

Este ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método direto MTT. Esta técnica de MTT é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função ou atividade bioquímica crítica. Este ensaio quantifica diretamente a atividade mitocondrial, medindo a formação de cristais de *formazan* de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais.

Sucintamente neste método, é adicionado um reagente MTT sobre o meio de cultura de células numa concentração final que varia entre 0.2 - 0.5 mg/ml, seguido de um período de incubação que varia entre 1 a 4 horas. A quantidade de *formazan*, que é diretamente proporcional ao número de células viáveis, é medida pela leitura da absorvância a um comprimento de onda de 570 nm usando um leitor de microplacas. As células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em *formazan* de cor azul através de uma reação de redução mitocondrial que envolve o NADH e outras moléculas redutoras que transferem elétrões para o MTT. Quando ocorre a apoptose celular, elas perdem a capacidade de converter o MTT em formazan. Assim o aparecimento de cor é um marcador de células viáveis (Riss *et al.*, 2004)

Em uma microplaca de 96 poços, adicionou-se 100 µl de meio de cultura com células vero em 6 poços, repetindo o mesmo para outros 6 poços em paralelo que serão usados como duplicado do ensaio. Depois a microplaca foi a incubar durante a noite. Após o período de incubação de 18 horas, fez se uma diluição de 50 µl de fração enzimática (0.170 mg/ml) em 500 µl de meio de cultura de células, obtendo uma concentração final de 17 µg/ml. Também fez uma diluição de 30 µl de solução de azida de sódio (5 mM) em 300 µl de meio de cultura, obtendo uma concentração final de 0.5 mM.

Removeu-se cuidadosamente 100 µl de meio de cultura do primeiro poço e adicionou-se 100 µl de solução de azida de sódio diluída em meio de cultura, marcando o primeiro poço como controlo positivo. No segundo poço também removeu-se cuidadosamente 100 µl de meio de cultura e pipetou-se 200 µl de solução enzimática diluída em meio de cultura. A partir do segundo poço fez-se uma diluição seriada de 100 em 100 µl até ao quinto poço, descartando os últimos 100 µl. O último poço em que não se adicionou a enzima, foi usado como controlo negativo. A microplaca foi posteriormente a incubar.

Após o período de incubação de 18 horas, adicionou-se 20 µl de reagente MTT (5 mg/ml) a cada poço e a microplaca foi a incubar durante 3 horas a uma temperatura de 37°C. Depois removeu-se com cuidado o meio de cultura dos poços e adicionou-se 150 µl de solvente de MTT e de seguida a microplaca foi para o agitador orbital durante 15 minutos. Fez-se a leitura da absorvância num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 570 nm.

## **18.2. Ensaio hemolítico**

Este ensaio hemolítico foi realizado em microplaca. Para a realização do ensaio procedeu-se à preparação de três amostras distintas, o controlo positivo, em que pipetou-se 95 µl de H<sub>2</sub>O MiliQ e 5 µl de sangue humano citratado para o primeiro poço da microplaca, o controlo negativo que consistiu em 95 µl de solução fosfato salino (PBS, pH 7.4) e 5 µl de sangue citratado e por fim a amostra com enzima pura que consistiu em 50 µl de PBS, pH 7.4, 5 µl de sangue citratado e 45 µl de fracção enzimática pura com uma concentração de 0.170 µg/µl.

A microplaca foi a incubar a uma temperatura de 37 °C, onde fez-se leituras de absorvância a um comprimento de onda de 620 nm em intervalos de 20 minutos até um período total de incubação de 60 minutos.

### III - Resultados

#### 1. Actividade proteolítica dos microorganismos

Os isolados que foram seleccionados para os ensaios de actividade proteolítica são produtores de proteases já anteriormente conhecidos. O objectivo desta determinação proteolítica foi pesquisar os isolados que produziam proteases em maior quantidade e com maior actividade sobre determinados substratos específicos como a azoalbumina e a caseína. Estas enzimas são sobretudo do tipo serino-proteases. Para além disso, estes ensaios foram realizados a diferentes condições de pH, o que permite estudar a forma como estas enzimas degradam os substratos em condições ácidas, neutras ou alcalinas.

Observando os dados de uma maneira geral verifica-se que existem duas amostras que se destacam das restantes pela elevada actividade proteolítica que apresentam. Estas são claramente as amostras S159c e a S127e, cuja a sua actividade foi máxima em todos os ensaios realizados, tanto nos ensaios em placa de caseína (**Gráfico 1**) como no ensaio da azoalbumina (**Gráfico 2**), havendo apenas uma ligeira variação de actividade entre as diferentes gamas de pH usadas nos ensaios.

Verifica-se também a existência de outras quatro amostras que apresentam uma actividade significativa, ou seja, as amostras cuja a sua actividade ultrapassa mais de 55% da amostra com actividade máxima no ensaio em placa de caseína (**Gráfico 1**). Estas são as amostras S118e, S160a, S157e e S126e. As amostras S118e, S160a e S157e aparentam possuir uma melhor actividade em meios com pH alcalino do que a pH neutro ou ácido, enquanto que a amostra S126e apresentou uma actividade que pouco variou com o pH do ensaio.

Em relação ao ensaio da azoalbumina (**Gráfico 2**), verifica-se claramente que as amostras com maior actividade são a S35b, S47a, S127e, S160a e S159c. Neste ensaio, embora tenha sido usado um substrato diferente, as amostras S159c e S127e também foram as que apresentaram maior actividade, confirmado o mesmo resultado obtido nos ensaios com caseína. No entanto verifica-se que a actividade das amostras neste ensaio varia significativamente entre as diferentes gamas de pH, principalmente nas amostras que obtiveram maior actividade. As proteases dos isolados S35b, S47a e S160a apresentam maior actividade em meios com pH alcalino, enquanto que nos isolados S127e e S159c funcionam claramente melhor a pH neutro.

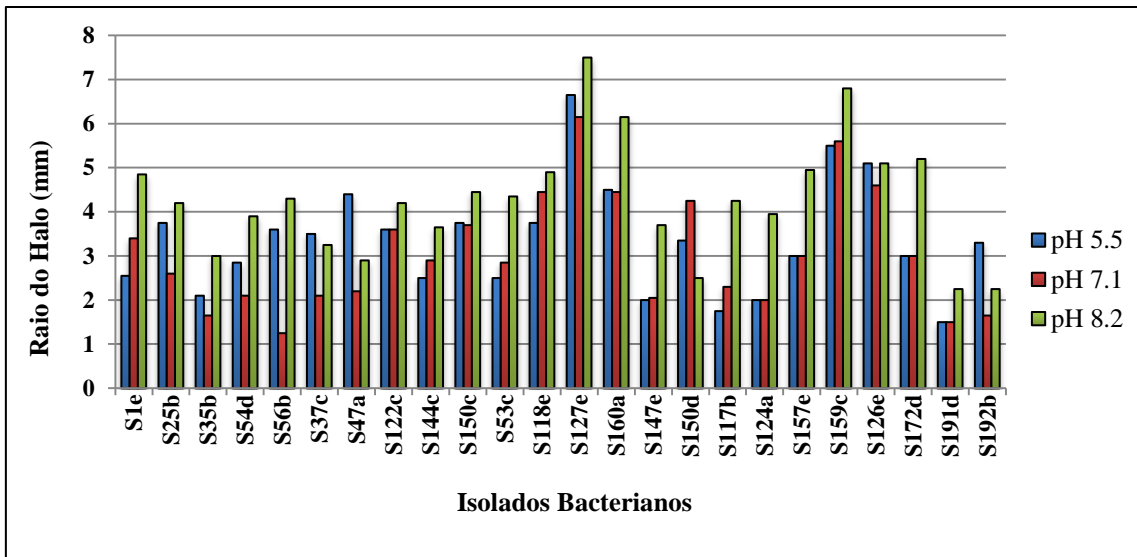


Gráfico 1: Ensaio enzimático em placa de caseína a 1 %

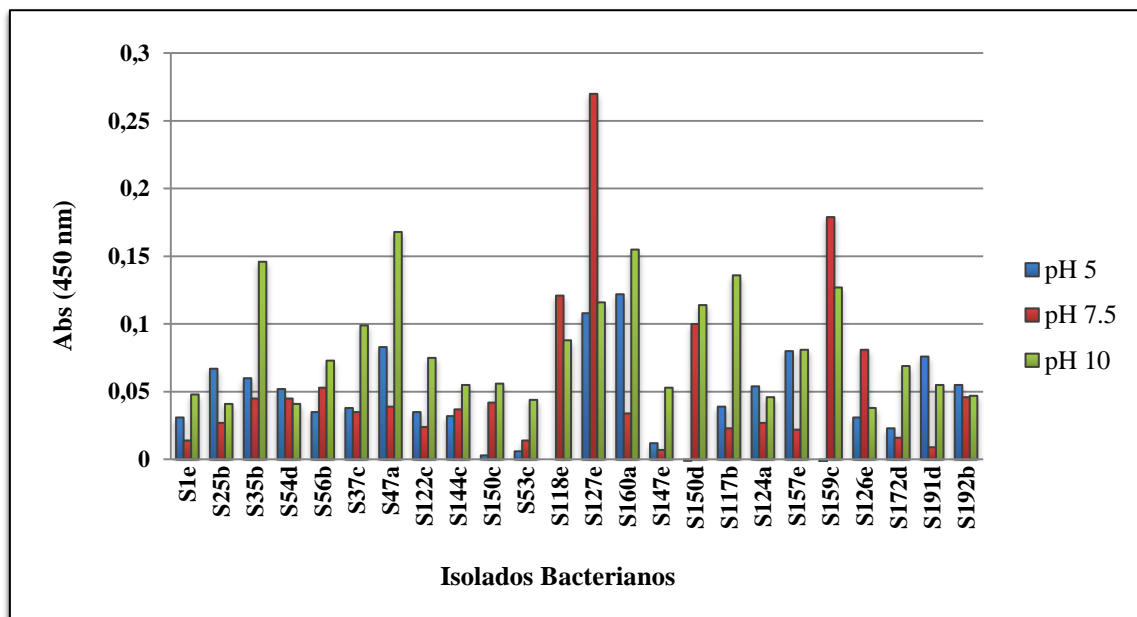


Gráfico 2: Ensaio enzimático com Azoalbumina 2%

## **2. Screening de actividade fibrinolítica**

### **2.1. Ensaio em placa de fibrina para detecção de actividade fibrinolítica**

Este ensaio em placa de fibrina permitiu fazer um *screening* de actividade fibrinolítica usando o sobrenadante rico em proteínas produzido pelos isolados bacterianos e do nematode como amostras. A actividade enzimática neste método é detectada através do aparecimento de halos de digestão ao redor dos pontos onde se aplicou as amostras. Portanto foi possível medir o raio dos halos em mm, produzidos por cada amostra aplicada. Para que seja possível a comparação das actividades e com o objectivo de provarmos que o método foi bem executado, aplicou-se uma amostra enzimática designada por urokinase, cuja a sua actividade fibrinolítica é conhecida e por isso muito utilizada como controlo positivo neste tipo de ensaios.

Observando os dados do **gráfico 3**, podemos constatar que foram detectadas 10 amostras com actividade, sendo que 6 destas são pertencentes a isolados bacterianos e 4 de amostras de ESP do nematode de diferentes condições. Os isolados com actividade foram: S150c, S127e, S147e, S157e, S159c e S126e, e as amostras do nematode com actividade apareceram ao décimo terceiro dia e entre o vigésimo segundo dia e o vigésimo oitavo dia após o início do estado de juvenis infectantes, em resistência trófica.

De entre as amostras dos isolados, a que apresentou significativamente maior halo de digestão foi a S127e, seguindo-se com relativamente menor actividade a S150c, S126e e S157e. A que obteve menor actividade dentro deste conjunto de amostras foi a S159c, sendo o seu halo de digestão enzimática muito reduzido na placa de agarose com fibrina. No que toca ao grupo de amostras de ESP de nematode a que obteve claramente maior halo de digestão foi ao vigésimo oitavo dia (amostra ESP 23/28D). A amostra ESP 13D e ESP 27D foram as que tiveram menor halo de digestão registado.

Relativamente à placa de fibrina que foi suplementada com plasminogénio, verificou-se que os halos de digestão produzidos pelas amostras foram idênticos em tamanho e número quando comparado com os halos correspondentes da placa sem plasminogénio em relação a todas as amostras que foram testadas neste ensaio. No entanto a urokinase que foi usada como controlo, apresentou uma ligeira diferença, ou seja, o seu halo de degradação foi maior na placa de fibrina com plasminogénio quando comparado com a placa sem plasminogénio.

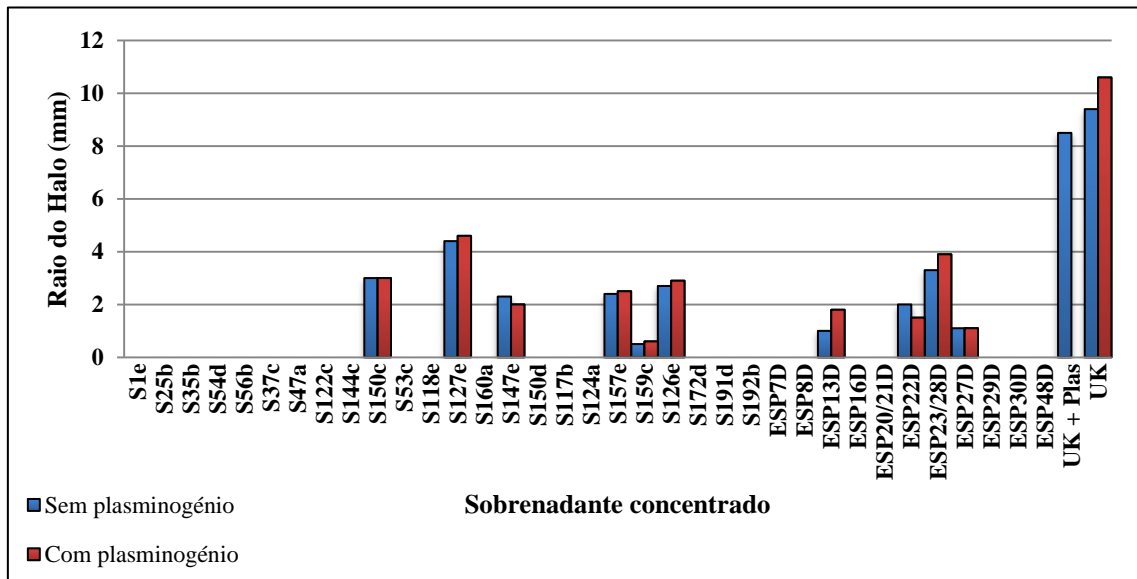


Gráfico 3: Ensaio em placa de fibrina. A dimensão dos halos indica a presença de actividade enzimática.

## 2.2. Actividade estimada a partir das unidades de actividade da urokinase

Uma vez conhecida a actividade da solução stock da urokinase (10 U/ $\mu$ l), foi possível estimar a actividade das amostras a partir das unidades de actividade da urokinase. No **gráfico 4** podemos observar que a amostra S127e tem 4680 unidades de actividade por ml, ou seja, quase metade da actividade da urokinase que se encontra purificada. Logo a seguir temos a amostra S150c com 3191 U/ml e as restantes amostras com uma actividade inferior a 3k U/ml.

Relativamente ao ESP do nematode, a amostra ESP 23/28D apresenta uma actividade de 3510 U/ml e a ESP 22D com 2127 U/ml, representando cerca de 20 a 35% da actividade total da urokinase pura, sendo portanto uma actividade elevada para este tipo de amostra.

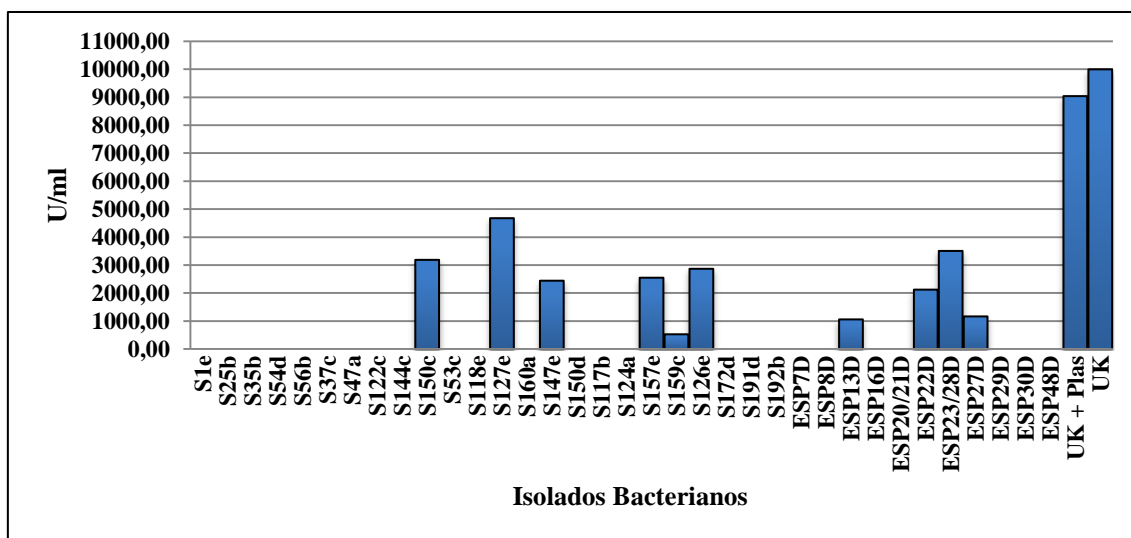


Gráfico 4: Ensaio em placa de fibrina. Atividade correspondente a unidades de urokinase por ml.

### 3. Identificação genética dos isolados com base no perfil PCR-ARDRA

De modo a agrupar geneticamente as diversas bactérias que participaram nos ensaios de actividade, procedeu-se à amplificação do gene 16S rRNA de todos os isolados bacterianos usados nesta tese e posteriormente foi obtido o perfil de restrição enzimática para cada um deles. Com os *primers* desenhados segundo Wu *et al.*, 2006, foi possível amplificar o gene 16S de todos os isolados, tendo-se obtido uma banda com 1.439 bp, que corresponde ao tamanho do fragmento esperado (**Figura 1**).

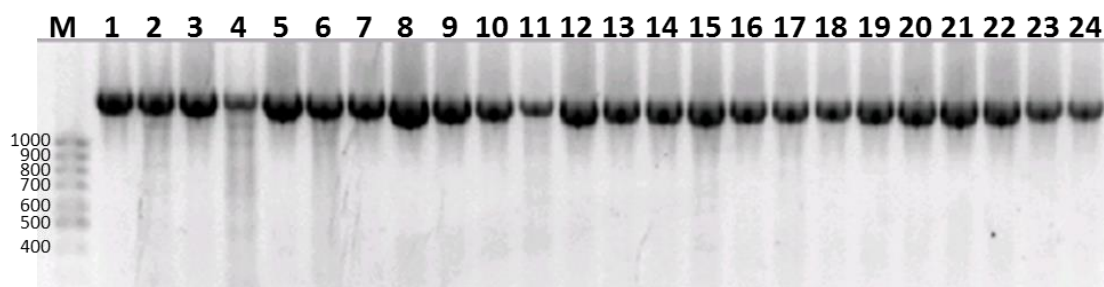
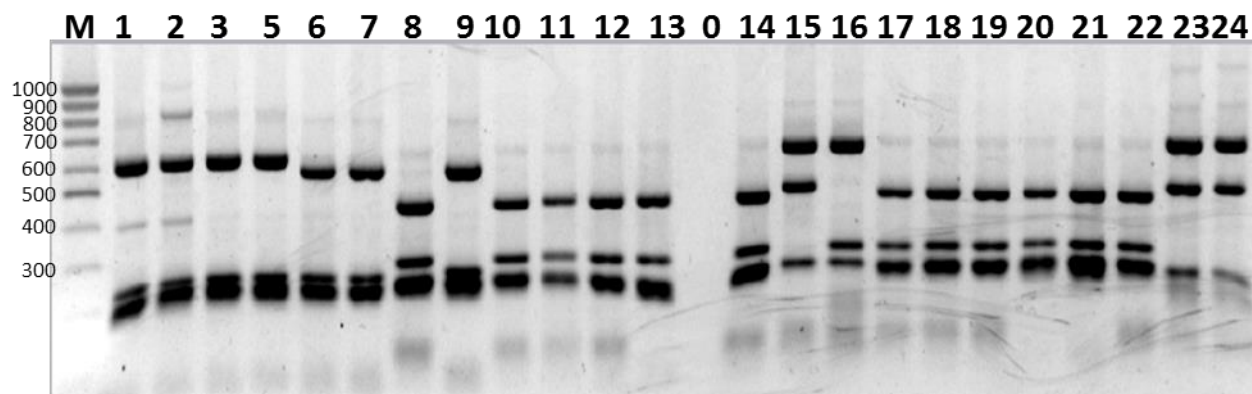


Figura 1: Amplicões do gene 16S dos 24 isolados obtidos em gel de agarose a 2%.

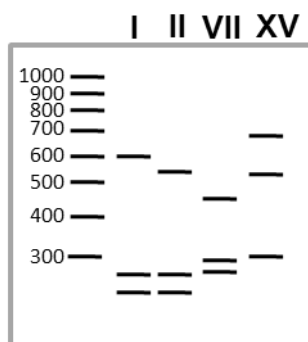
O gene 16S amplificado foi depois fragmentado através da enzima de restrição AluI que reconhece a sequência 5'-AGCT-3' como local de clivagem, dando origem a fragmentos com pontas cegas de diferentes tamanhos. Neste caso através da análise dos perfis de restrição do DNA ribossômico é possível obter padrões únicos e distinguíveis capazes de diferenciar vários

grupos genéticos de *Bacillus*. Por separação em gel de electroforese foi possível obter os diferentes perfis ARDRA dos isolados bacterianos (**Figura 2**).



**Figura 2:** Perfis de restrição ARDRA obtidos com a enzima AluI. Os números representam por ordem crescente os seguintes isolados: S1e, S25b, S35b, S56b, S37c, S47a, S122c, S144c, S150C, S53c, S118e, S127e, S160a, S147e, S150d, S117b, S124a, S157e, S159c, S126e, S172d, S191d e S192b. Separação por em agarose a 2%.

Obeve-se quatro perfis de restrição distintos (**Figura 3**) que permitiu agrupar os diferentes isolados nos grupos I, II, VII e XV. O perfil de restrição do grupo I compreende um fragmento de 600 bp, outro de 220 bp e um terceiro de 180 bp. O grupo II apresenta um perfil idêntico ao I, excepto no fragmento maior que é de 550 bp. O grupo VII com três fragmentos, um de 450 bp, 280 bp e 230 bp. Por fim o grupo XV, com 700 bp, 500bp e 300 bp.



**Figura 3:** Quatro grupos distintos de perfis de restrição do gene 16S rRNA obtidos com AluI

O perfil ARDRA do grupo genético I, corresponde às espécies de *B. cereus*, *B. anthracis* ou ainda *B. thuringiensis* e do grupo II, fazem parte o *B. mycoides* e *B. weihenstephanesis*. O perfil do grupo genético VII corresponde a um maior número de espécies de bactérias e estas podem ser o *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus* ou *B. amyloliquefaciens*.

Já o grupo genético XV tem um perfil muito particular para o qual apenas se encontrou três isolados correspondentes.

Observando a **tabela 5**, é possível ver os isolados com um perfil correspondente a cada grupo genético e pode-se confirmar que o grupo VII é o maior no que toca a isolados correspondentes e espécies conhecidas. Outra particularidade está no facto de os isolados com actividade fibrinolítica confirmada nos ensaios de *screening*, pertencerem todos a este grupo VII, excepto o isolado S147e que pertence ao grupo genético XV cuja as espécies não são conhecidas ou ainda não foram identificadas noutros trabalhos.

**Tabela 5: Os diferentes grupos genéticos a que pertencem os 24 isolados.**

<b>Identificação genética</b>	<b>Isolados</b>	<b>Espécies</b>
<b>Grupo I</b>	S1e, S25b, S35b, S56b e S150d	<i>B. cereus group (B. cereus, B. anthracis)</i> ou <i>B. thuringiensis</i> .
<b>Grupo II</b>	S37c, S47a e S144c	<i>B. mycoides, B. weihenstephanesis</i>
<b>Grupo VII</b>	S122c, S150c, S53c, S118e, S127e, S160a, S117b, S124a, S157e, S159c, S126e e S172d	<i>B. subtilis, B. pumilus, B. atrophaeus</i> ou <i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>Grupo XV</b>	S147e, S191d e S192b	Desconhecido

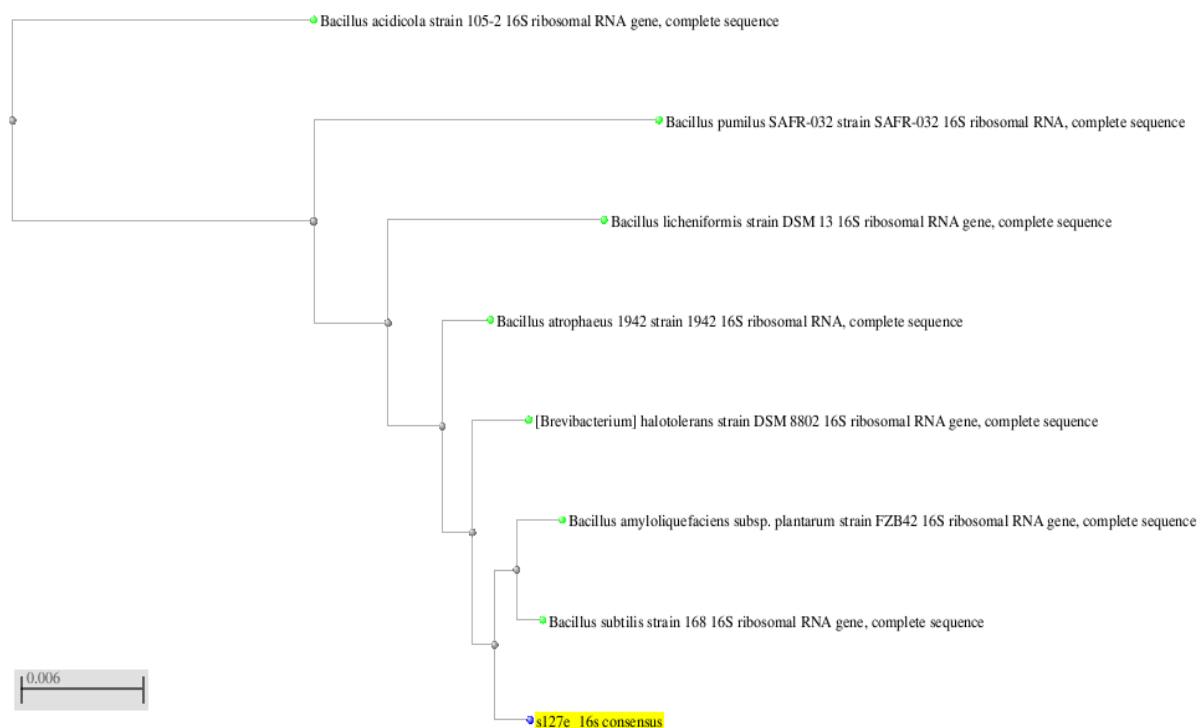
#### **4. Identificação do isolado S127e com base na análise da sequência 16s**

Nesta tese foi estudada a actividade fibrinolítica de 24 isolados e do nematode *Steinernema Carpopocapsae*, mas apenas um dos microrganismos foi seleccionado para dar continuidade ao estudo que envolveu a purificação da enzima fibrinolítica, a caracterização bioquímica, determinação da actividade e a realização de ensaios biológicos importantes. O isolado com maior potencialidade seleccionado foi o S127e, por ser o microrganismo que apresentou maior actividade tanto nos ensaios proteolíticos com substratos generalistas como nos ensaios de actividade fibrinolítica, o que indicou a presença de uma enzima com actividades muito interessantes para o estudo.

Assim foi importante avançar com a identificação do isolado S127e com base na análise da sequência do gene 16S. Após a amplificação do gene 16S rRNA do isolado S127e, para além da determinação do grupo genético pela obtenção de um perfil ARDRA como descrito anteriormente, outra parte do produto amplificado foi purificada e mandado para sequenciar.

Após a análise da sequência 16S do isolado S127e através do alinhamento com sequências da base de dados do NCBI, verificou-se que existe uma grande identidade com as

espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, com uma percentagem de identidade superior a 99% para ambas as espécies, sendo a proximidade filogenética elevada. Também foi obtido outras homologias com uma percentagem de identidade inferior e portanto com uma maior distância filogenética, estas foram as espécies do grupo *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. acidicola* (**Figura 4**).



**Figura 4:** Árvore filogenética baseada no alinhamento do gene 16S rRNA do isolado S127e com sequências da base de dados do NCBI.

## 5. Perfil enzimático das amostras com actividade fibrinolítica

Realizou-se um zimograma com as amostras de sobrenadante rico em proteínas dos isolados e do nematode, cuja actividade fibrinolítica tinha sido detectada anteriormente nos ensaios de *screening*, o que permitiu obter perfis de bandas de digestão da fibrina.

Como se pode observar no gel SDS-PAGE suplementado com fibrina (**Figura 5**), os perfis de digestão são diferentes entre os vários isolados. Cada isolado apresenta varias bandas de digestão separadas ao longo do gel, indicando que poderá ter ocorrido degradação das próprias enzimas fibrinolíticas, não havendo uma única banda definida, no entanto, em cada amostra em separado, existe pelo menos uma banda cuja a degradação foi maior (banda com cor mais intensa), o que indica maior quantidade de enzimas fibrinolíticas activas nessa região e é possível estimar o tamanho molecular destas mesmas enzimas.

A amostra S127e apresenta uma banda de digestão bem definida com cerca de 40 kDa de tamanho molecular, indicando a presença de uma enzima com elevada actividade fibrinolítica e confirmando os resultados dos ensaios em placa de fibrina. Relativamente às restantes amostras, as bandas de digestão são ténues e dispersas, o que não permite estimar com clareza o tamanho molecular das enzimas fibrinolíticas, por não existir uma banda que se destaque das outras em intensidade, o que indica maior actividade na respectiva zona do gel.

Relativamente às amostras ESP do nematode, podemos verificar que o padrão de digestão é igual entre as duas amostras de ESP, no entanto a amostra ESP 23/28D apresenta bandas mais intensas, indicando maior quantidade de enzimas fibrinolíticas, o que está de acordo com os resultados obtidos no ensaio em placa de fibrina. À semelhança da amostra bacteriana S127e, também apresenta uma banda de digestão mais intensa com cerca de 40 kDa de tamanho molecular em ambas amostras de ESP. No caso da urokinase, apesar de apresentar um arrastamento de digestão, verificou-se que a zona com maior digestão corresponde a um tamanho molecular de 30 kDa, pelo que está próximo do seu tamanho molecular real.

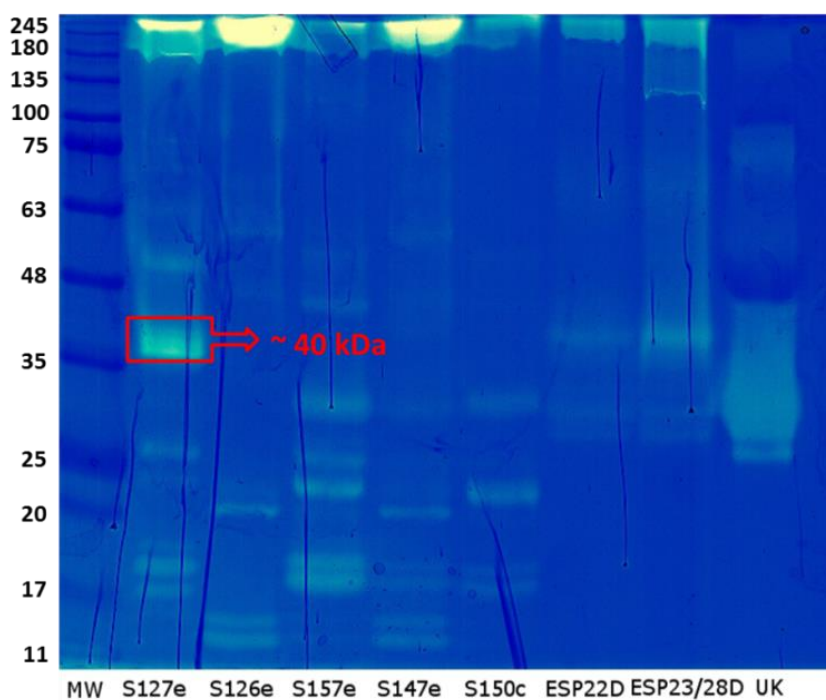
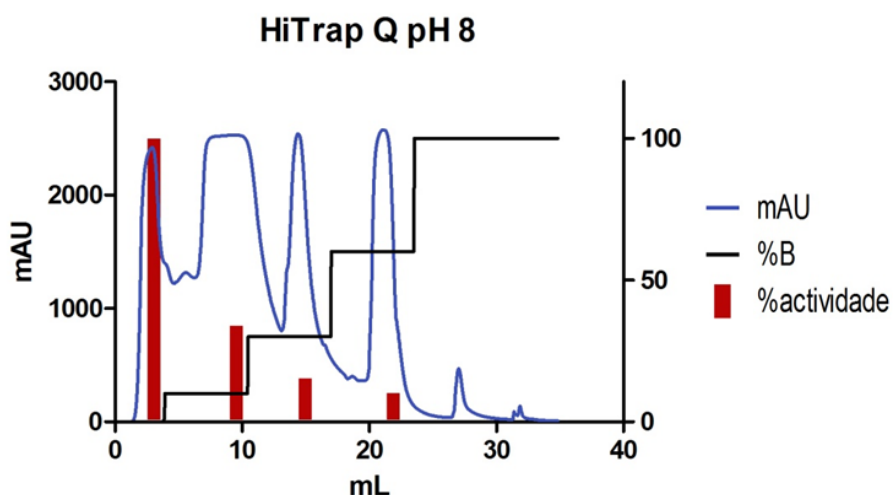


Figura 5: Zimograma obtido em fibrina dos isolados S127e, S126e, S157e, S147e e S150c. MW – Marcador molecular; UK - Urokinase; ESP – produtos secretados-excretados do nematode.

## 6. Purificação da enzima fibrinolítica do isolado S127e

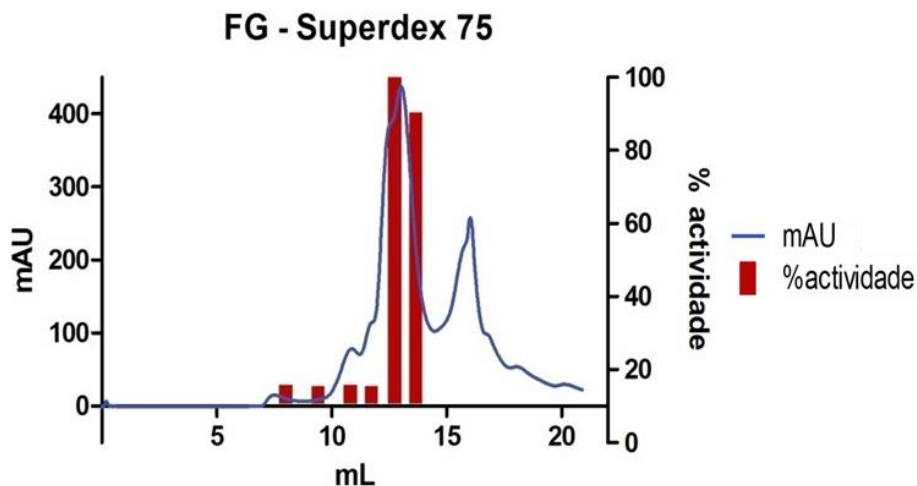
### 6.1. Actividade das fracções obtidas ao longo das separações cromatográficas

Na primeira separação cromatográfica de troca aniónica (**Gráfico 5**), obteve-se quatro picos de proteínas. Após a recolha das fracções correspondentes a cada pico e a actividade testada com o substrato cromogénico (Suc-AAPF-pNa), verificou-se que o pico de proteínas com maior actividade foi o da exclusão. A pH 8, a proteína de interesse estava carregada positivamente e saiu na exclusão da cromatografia, sendo que as restantes proteínas saíram à medida que o gradiente de concentração do eluente aumentou.



**Gráfico 5:** Cromatografia de troca aniónica com coluna HiTrapQ. mAU – Absorvância; %B- gradiente salino; %actividade com substrato específico (Suc-AAPF-pNa).

As fracções correspondentes ao pico da exclusão foram designadas por HQ e submetidas posteriormente a uma cromatografia de separação por tamanho molecular (**Gráfico 6**). Nesta fase cromatográfica obteve-se essencialmente dois picos de proteínas. Após o teste de actividade das fracções com o substrato cromogénico, verificou-se que duas fracções apresentaram elevada actividade e que correspondiam ao pico maior de proteínas. O pico menor, não apresentou actividade nas suas fracções correspondentes.



**Gráfico 6: Cromatografia de separação por tamanho molecular (Gel Filtration) com coluna Superdex-75. mAU – Absorvância; %actividade com substrato específico (Suc-AAPF-pNa).**

Por fim as duas fracções com maior actividade obtidas na cromatografia Gel Filtration foram designadas por HQFG e submetidas a uma cromatografia de troca catiónica (**Gráfico 7**). Nesta separação cromatográfica, obteve-se três picos de proteínas. O primeiro pico com tamanho intermédio, saiu na exclusão e não apresentou fracções com actividade, o segundo pico menor de todos, apresentou uma fracção com 50% de actividade e por fim o pico de proteína maior, apresentou um valor máximo de actividade. A fracção correspondente ao pico máximo contém a proteína de interesse, que a pH 6, está carregada positivamente e ficou retida na fase estacionária com uma força iónica moderada e saiu assim que o gradiente do eluente aumentou.

A fracção enzimática pura obtida nesta fase foi designada por HS e foi possível aumentar o seu grau de purificação aplicando novamente a fracção a uma cromatografia de troca catiónica com maior força iónica e que permite uma maior resolução dos picos obtidos (MonoS). Esta última separação cromatográfica permitiu resolver o pico máximo obtido anteriormente e recolher a fracção com maior actividade correspondente a um único pico de proteína pura que passou a ser designado por HS.

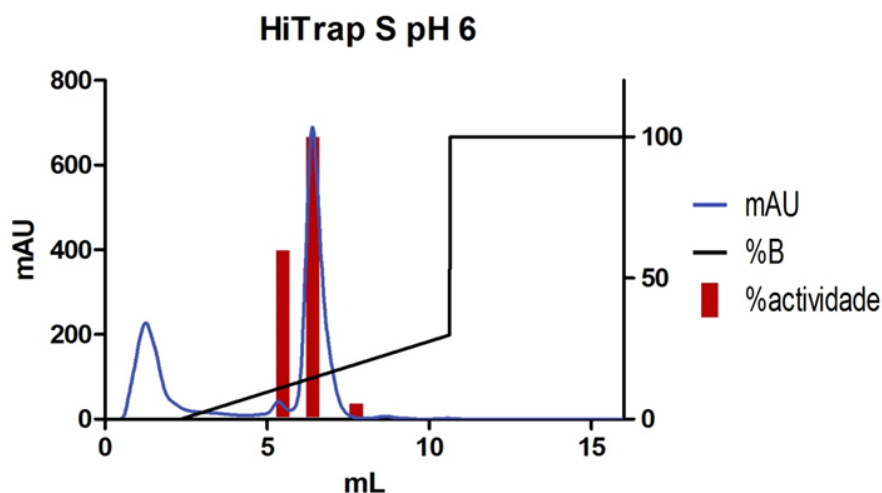
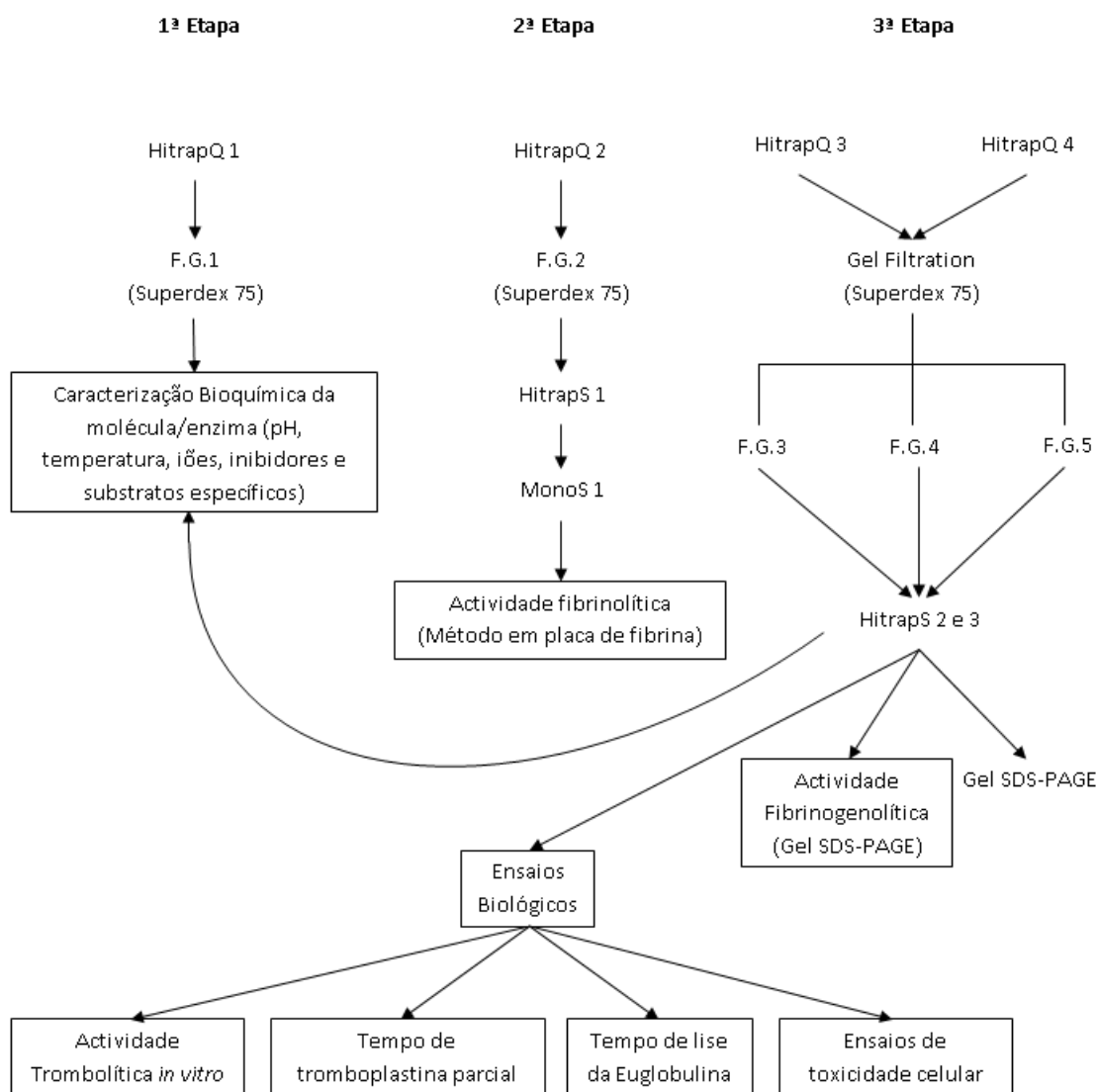


Gráfico 7: Cromatografia de troca catiônica com coluna HiTrapS. mAU – Absorvância; %B- gradiente salino; %atividade com substrato específico (Suc-AAPF-pNa).

## 6.2. Etapas de purificação da proteína

O fracionamento da proteína foi realizado em três etapas (**Figura 6**). Na primeira etapa foi realizado apenas uma HitrapQ e depois uma FG com Superdex 75, onde se selecionou as frações com atividade sobre o substrato específico e efetuou-se a caracterização bioquímica da molécula, incluindo a determinação da temperatura e pH ótimo, bem como o efeito de diversos iões e inibidores na atividade enzimática. Na seguinte etapa, para além da FG também realizou-se uma HitrapS e uma MonoS, obtendo frações com a proteína pura que foi posteriormente submetida à determinação da actividade fibrinolítica através do método em placa de fibrina.

Por fim, na última etapa, foi necessário obter uma maior quantidade de enzima e para isso realizou-se duas HitrapQ, três gel filtration e duas HitrapS, onde foi possível obter uma quantidade significativa de amostra para completar a caracterização bioquímica da molécula, através da determinação dos substratos específicos, bem como a realização de ensaios biológicos e citotóxicos importantes. Para além disso também determinou-se o grau de purificação da molécula, quantificando as proteínas, bem como atividade específica presente nas frações obtidas em cada *step* cromatográfico, sendo que essas amostras foram depois aplicadas em um gel de SDS-PAGE. A atividade fibrinogenolítica foi estimada pela obtenção de um perfil de degradação proteica do fibrinogénio que foi aplicado junto com a enzima num gel de SDS-PAGE.



**Figura 6: Etapas do fraccionamento da enzima fibrinolítica.**

## 7. SDS-PAGE das fracções da purificação

O SDS-PAGE com as fracções obtidas em cada separação cromatográfica permitiu confirmar a purificação crescente desde o sobrenadante até à fracção enzimática pura pela análise do padrão de bandas de proteínas (**Figura 7**). O sobrenadante do isolado S127e e a fracção HQ3&4 apresentam várias bandas proteicas, todas elas com um peso molecular superior a 17 kDa. Verifica-se ainda que o padrão de bandas é idêntico entre ambas as amostras, no entanto as bandas da fracção HQ são mais definidas e visíveis, indicando uma maior

concentração de proteínas. Nesta primeira fracção obtida o nível de purificação ainda é baixo, mas a quantidade de proteína por volume é maior e conseqüentemente a actividade também.

Ao analisar o padrão de bandas da amostra seguinte, HQFG3, verificou-se uma redução significativa no número de bandas, nomeadamente as correspondentes a proteínas de peso molecular mais elevado (> 35 kDa), indicando um certo nível de purificação, pela eliminação de proteínas não desejáveis da amostra.

Analizando a amostra HS resultante da cromatografia de troca catiónica, verificamos a existência de uma banda proteica bem definida e visível na ordem dos 27 kDa, indicando um elevado grau de purificação, no entanto ainda se nota a existência de uma banda muito ténue com aproximadamente 48 kDa e portanto esta fracção enzimática não se encontra totalmente pura, podendo ter resíduos de outra proteína. Por fim analisando a fracção MS que foi obtida na cromatografia de troca catiónica de maior resolução, verificamos a existência de uma única banda com aproximadamente 27 kDa que corresponde à enzima fibrinolítica, indicando que amostra está pura.

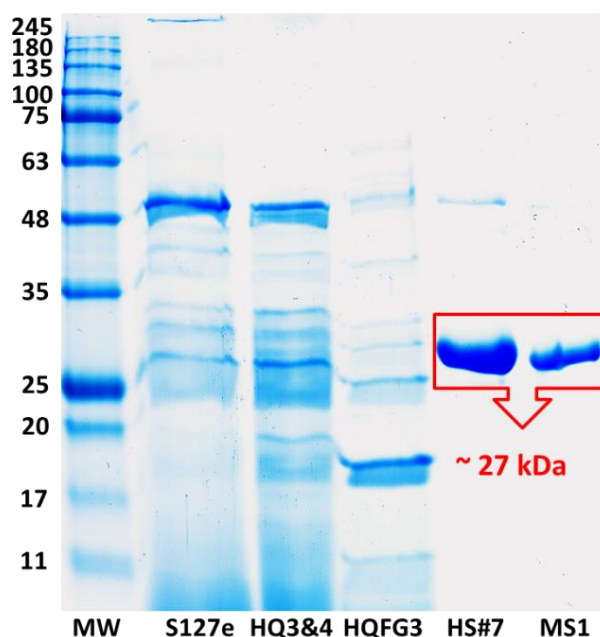


Figura 7: Gel de electroforese SDS-PAGE com as várias fracções obtidas em cada separação cromatográfica.

Para além da realização de um SDS-PAGE para averiguar o grau de purificação, também determinou-se as unidades de actividade específica por mg das amostras obtidas em cada cromatografia. Para isso determinou-se a velocidade da reacção enzimática de cada amostra com o substrato cromogénico (Suc-AAPF-pNa) ao longo do tempo através do cálculo do declive da reta e quantificou-se as proteínas de cada amostra (**Tabela 6**). Verificou-se que as

unidades de actividade por mg aumentam significativamente desde a amostra de sobrenadante inicial até à obtenção da fracção pura, que registou um valor máximo de 5421 U/mg. O factor de purificação da fracção enzimática pura (HS#7) foi de 1114.

**Tabela 6: Tabela de purificação da enzima do isolado S127e**

<b>Amostra</b>	<b>ml</b>	<b>mg/ml</b>	<b>[mg]</b>	<b>Total act (U)</b>	<b>Sp act (U/mg)</b>	<b>Factor purificação</b>
<b>S127e</b>	2	272,8	545,6	2655	5	
<b>HQ3&amp;4</b>	0,8	19,26	15,408	1604	104	<b>21</b>
<b>HQFG3</b>	0,8	2,1	1,68	1357	808	<b>166</b>
<b>HS#7</b>	1,4	0,49	0,686	3718	5421	<b>1114</b>

## 8. Identificação da proteína fibrinolítica por Ms/Ms

A banda de 27 kDa correspondente à enzima fibrinolítica foi analisada por Ms/Ms, tendo-se obtido um bom espectro de massa (**Tabela 7**). Através da análise por espectrometria de massa da proteína, obteve-se uma identificação com um *score* de 505 muito significativo para duas proteínas homólogas, uma referenciada como *fibrinolytic enzyme* de *Micrococcus luteus* (nº acesso do NCBI gi|159149224) e outra como *lytic enzyme L27* de *Bacillus subtilis* (nº acesso do NCBI gi|3986320), com um peso molecular estimado de 27.44 kDa e 27.47 kDa, respectivamente.

Uma das proteínas identificadas como homólogas está anotada no NCBI como sendo uma enzima fibrinolítica de *Micrococcus luteus*, confirmando o tipo de actividade da enzima que foi purificada nesta tese e à qual designámos por BK (*Bacillus-kinase*). No entanto a outra proteína identificada como homóloga pertence a um *Bacillus subtilis* e está anotada no NCBI como sendo uma enzima (*lytic enzyme L27*) cuja sua actividade é desconhecida.

Tabela 7: Identificação por Ms/Ms da banda de 27 kDa correspondente à enzima fibrinolítica purificada.

Informação peptídica da enzima fibrinolítica							
Banda de 27 kDa							
Proteína	Bactéria	Calc. Mass	Obsrv. Mass	± da	Péptidos	Ion score	Score da proteína
fibrinolytic enzyme (gi 159149224) lytic enzyme L27 (gi 3986320)	<i>Micrococcus luteus</i>	980,4894	980,4789	-0,0105	SSLENTTTK	11	505
		1033,4989	1033,4559	-0,043	LGDAFYYGK	53	
		1252,6182	1252,5638	-0,0544	HPNWTNTQVR	71	
	<i>Bacillus subtilis</i>	1276,6896	1276,6349	-0,0547	AQSVPYGVSQIK	59	
		1513,7759	1513,7217	-0,0542	APALHSQGFTGS NVK	136	
		1661,8606	1661,7894	-0,0712	YPSVIAVGAVNS SNQR	163	

## 9. Caracterização bioquímica da enzima

### 9.1. Condições ótimas de funcionamento da enzima

No ensaio da fracção enzimática com azoalbumina a diferentes temperaturas (**Gráfico 8**), verificou-se que a actividade foi máxima a uma temperatura de 48°C, sendo esta a temperatura óptima de funcionamento da enzima. Curiosamente a uma temperatura de 60°C a actividade mantém-se elevada, ainda superior do que no caso da temperatura a 37°C. A actividade é baixa a temperaturas mais frias (<16°C).

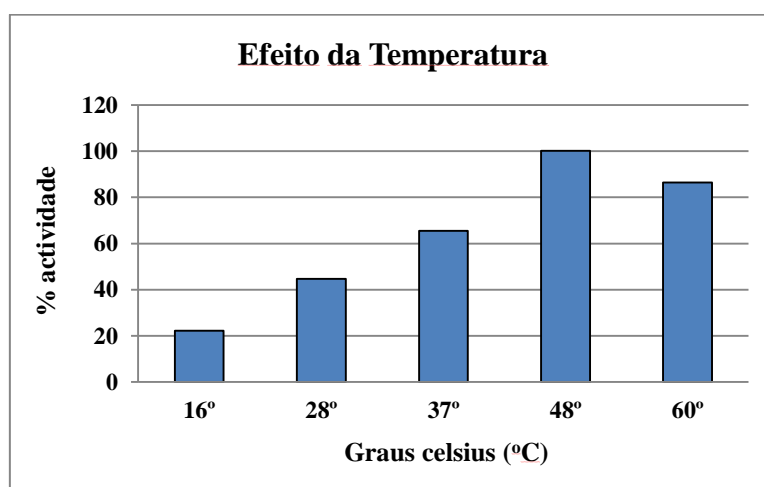
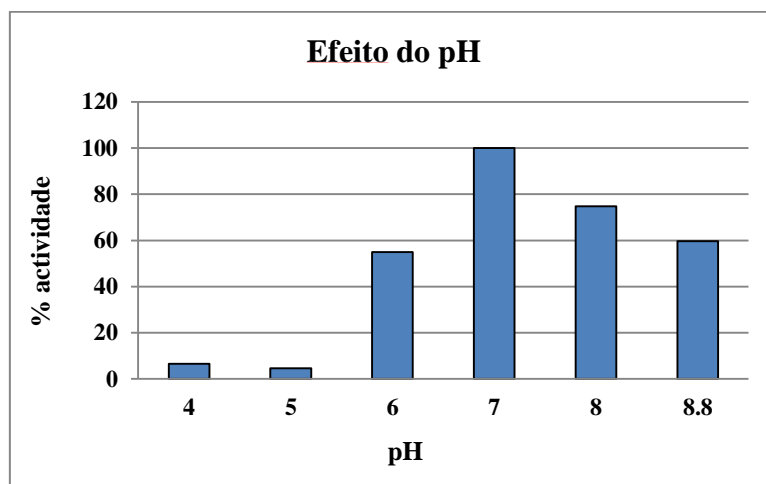


Gráfico 8: Efeito da temperatura na actividade enzimática com o substrato generalista azoalbumina.

Relativamente ao ensaio com azoalbumina a diferentes gamas de pH (**Gráfico 9**), verificou-se que a actividade foi máxima a um pH 7, indicando que a enzima tem um funcionamento óptimo em meios com pH neutro. No entanto a actividade ainda foi elevada a pH 6 e nas gamas de pH 8. Já em meios mais ácidos a actividade baixou drasticamente, nomeadamente a pH 4 e 5.

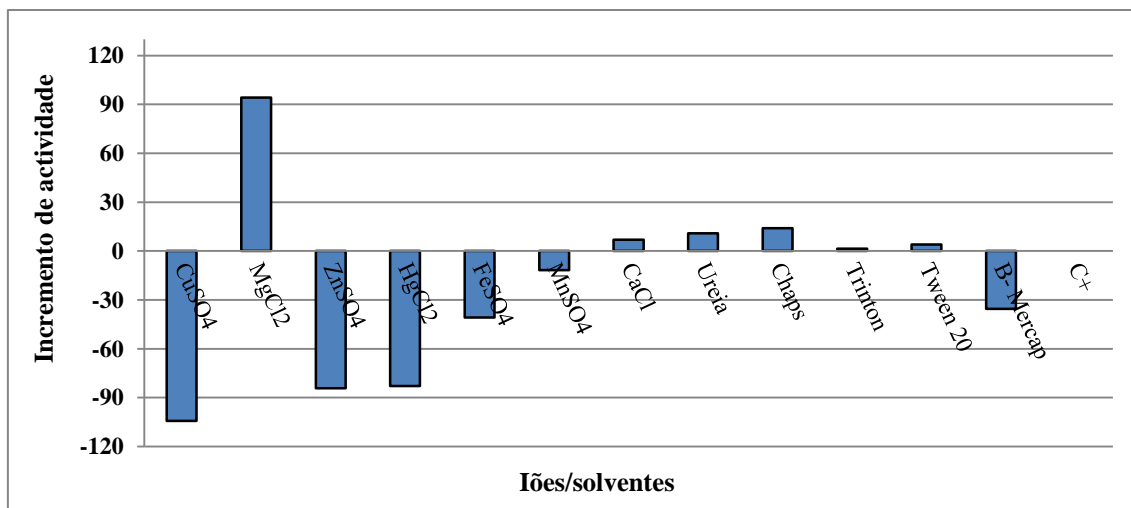


**Gráfico 9:** Efeito do pH na actividade enzimática com o substrato generalista azoalbumina.

## 9.2. Efeito dos diversos iões/solventes e dos inibidores na actividade enzimática

No ensaio com azoalbumina a diferentes iões e solventes usados (**Gráfico 10**), verificou-se que os iões  $MgCl_2$  e o  $CaCl$ , contribuem com o aumento da actividade da enzima, no entanto o cofactor ideal da enzima é o magnésio, uma vez que este atinge um incremento de actividade na ordem dos 90%, enquanto que o cálcio apenas contribui com um ligeiro incremento da actividade. Todos os restantes iões provocam uma inibição da actividade, sendo o  $CuSO_4$  o que inibe totalmente a actividade enzimática, o  $ZnSO_4$  e  $HgCl_2$  inibem a actividade na ordem dos 80%, o  $FeSO_4$  na ordem dos 40% e o  $MnSO_4$  inibe muito pouco.

Relativamente aos solventes, a Ureia e o Chaps parecem melhorar ligeiramente a actividade, no entanto o  $\beta$ -mercaptoethanol inibe a actividade enzimática na ordem dos 35%.



**Gráfico 10: Efeito dos íons e solventes na actividade enzimática com o substrato generalista azoalbumina.**

No ensaio azoalbumina em que se pretendia ver o efeito dos inibidores sobre a actividade enzimática (**Gráfico 11**), participaram no total 12 inibidores enzimáticos diferentes onde foi possível determinar a % de inibição de cada um deles sobre a enzima em estudo.

Observando os dados de uma maneira geral, verificou-se que a Quimostatina e o PMSF foram os que obtiveram maior percentagem de inibição sobre a enzima BK de 66% e 30%, respectivamente. A Quimostatina é um inibidor forte de muitas proteases, nomeadamente a quimotripsina, serina-proteases do tipo quimotripsina, quimases e as cisteínas proteases lisossomais como as captasinas B, H e L. Já o PMSF é um inibidor de grande espectro de acção sobre serina-proteases. Também sabe-se que inibe algumas cisteínas proteases como a papaína. Os resultados destes dois inibidores por si só são bastante informativos quanto à enzima BK, indicando que esta pertence à família das serina-proteases do tipo quimotripsina.

Relativamente aos outros inibidores, verificamos que a percentagem de inibição é baixa, sendo inferior a 25%, no entanto, dentro deste grupo, o EDTA, Antitrombina, Leupeptina e a Benzamidina foram os que apresentaram maior percentagem de inibição, 25%, 23%, 18% e 16% respectivamente. O EDTA é um inibidor de metaloproteinasas dependentes de zinco, bem como outras enzimas que são estabilizadas pelo cálcio e que podem ser bastante inibidas por agentes quelantes. Já a Antitrombina aqui usada é um inibidor de trombina, calicreína, plasmina, tripsina e dos factores IXa, Xa e XIa da cascata de coagulação. A Leupeptina e a Benzamidina são inibidores de serina-proteases e de enzimas do tipo tripsina.

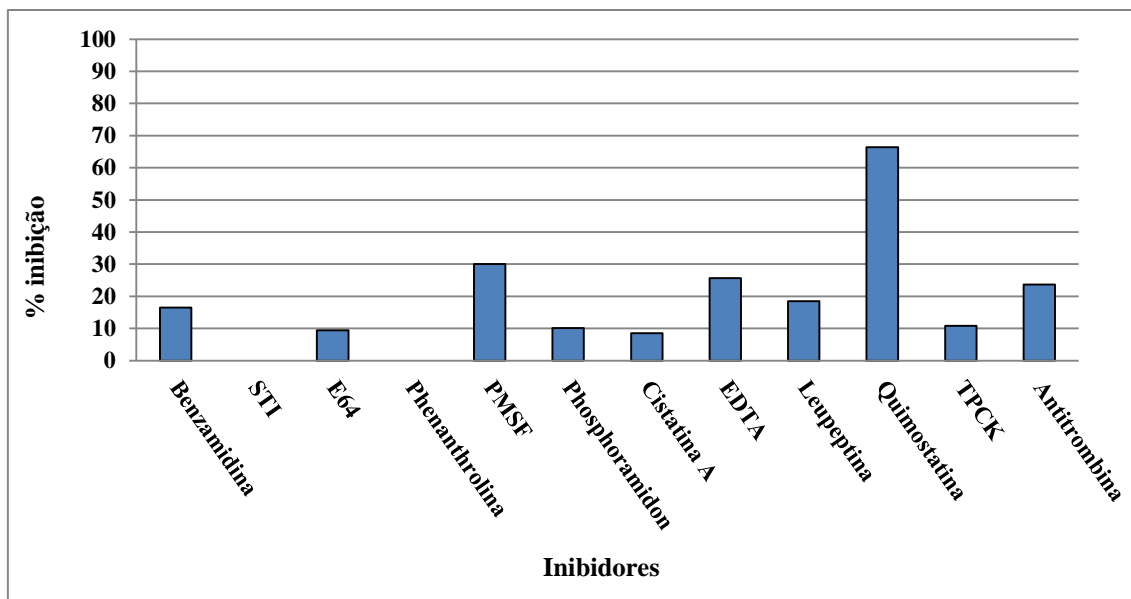


Gráfico 11: Efeito dos diversos inibidores na actividade enzimática com o substrato generalista azoalbumina.

### 9.3. Substratos específicos

Este ensaio com a fracção enzimática pura, envolveu o uso de 12 substratos específicos cromogénicos que quando hidrolisados dá-se a libertação do grupo cromóforo emitindo uma cor amarela quantificável. Analisando a leitura da absorvância registada para cada substrato específico (**Gráfico 12**), verificou-se um aumento acentuado nos valores de absorvância do substrato Suc-AAPF-pNa ao longo do tempo, o mesmo aconteceu com o substrato Suc-AAPF-pNa, mas de forma muito menos acentuada. A enzima apenas degradou estes dois substratos, tendo mostrado uma maior especificidade para com o substrato Suc-AAPF-pNa, cujo valor de absorvância foi 5x superior do que o substrato Suc-AAPM-pNa. Estes dois substratos são específicos para quimotripsinas e catepsinas G, confirmando uma vez mais que a enzima purificada em questão pertence à família das serina-proteases do tipo quimotripsina.

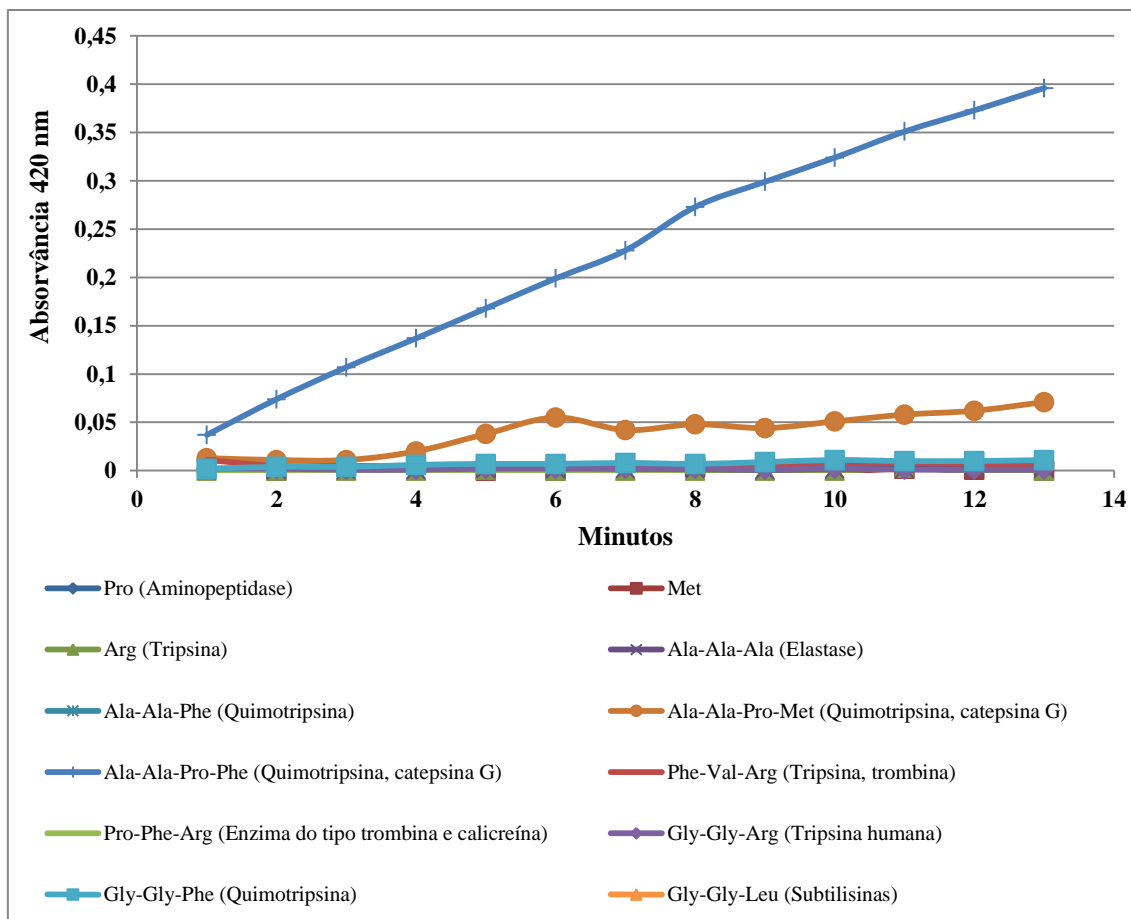
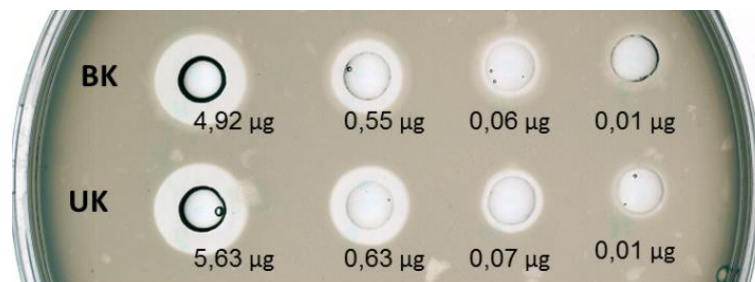


Gráfico 12: Ensaio enzimático com 12 substratos específicos diferentes.

## 10. Determinação da actividade fibrinolítica da fracção pura

O ensaio em placa de fibrina permitiu estimar e comparar directamente a actividade fibrinolítica da enzima BK. A actividade fibrinolítica da enzima purificada foi estimada em placa de fibrina pela aplicação em simultâneo da urokinase comercial em concentrações equivalentes (**Figura 8**). Após duas horas de incubação, tanto a enzima BK como a urokinase, formaram halos de digestão com dimensão semelhante para cada concentração testada em placa de fibrina, demonstrando que ambas as enzimas apresentam a mesma actividade por quantidade de proteína.



**Figura 8:** Ensaio em placa de fibrina (2 horas) com amostra purificada. Foi aplicado a amostra (4,589 mg/ml) diluída em 20x, 200x, 2000x e 20000x e o controlo positivo Urokinase (2,532 mg/ml) diluído em 10x, 100x, 1000x e 10000x.

Estando ambas as enzimas na mesma concentração, foi possível calcular a constante de actividade segundo (Wang *et al.*, 2012), que relaciona o raio do halo com o tempo de difusão da digestão enzimática na placa de fibrina ( $\frac{R}{\sqrt{t}}$ ), para ambas as enzimas, o que permitiu estimar as unidades de actividade da enzima de interesse a partir da actividade conhecida da urokinase comercial (**Tabela 8**).

A constante de actividade obtida para a enzima BK e para a urokinase, foi de 1.86 e 1.98 respectivamente. As constantes de actividade de ambas as enzimas são muito idênticas, o que vem confirmar que possuem a mesma actividade por quantidade de proteína. Sabendo que a urokinase comercial tem 4 unidades de actividade por µg de proteína, então a enzima BK apresenta também uma actividade de 4 U/µg.

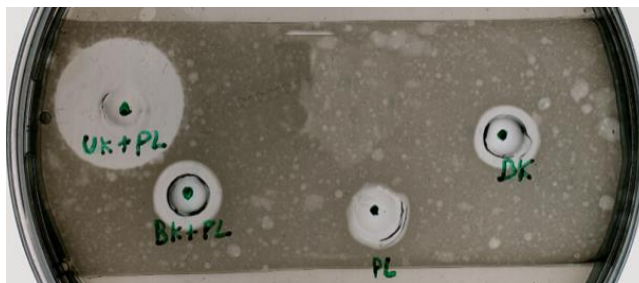
**Tabela 8:** Cálculo da constante de actividade para os diferentes tempos de incubação e estimativa das unidades de actividade por ug através da urokinase conhecida.

Constante de actividade: $n = \frac{R}{\sqrt{t}}$		
Tempo (h)	BK (250 mg/L)	UK (281 mg/L)
1	1,800	1,85
2	1,838	1,980
3	1,934	2,107
<b>Média</b>	1,858	1,979
<b>U/µg</b>	4	4

Relativamente ao ensaio de activação do plasminogénio (**Figura 9**), o objectivo foi determinar se a enzima BK é capaz de degradar a fibrina de forma indirecta pela activação do plasminogénio, à semelhança do que acontece com a urokinase. A urokinase é capaz de degradar directamente a fibrina, no entanto actua preferencialmente pela activação do plasminogénio em plasmina. A plasmina por sua vez digere a fibrina.

Recorrendo ao ensaio em placa de fibrina foi possível determinar se a enzima BK é um activador do plasminogénio. Para isso tanto a urokinase como a enzima BK foram aplicadas em concentrações reduzidas com o plasminogénio numa concentração elevada. Ao analisar os halos de digestão, verificou-se que o halo de digestão da urokinase com o plasminogénio foi cerca de 4x superior ao halo de digestão formado pela combinação da enzima BK com o plasminogénio.

Para além disso, o halo da amostra combinada enzima BK com o plasminogénio é igual à amostra de enzima BK aplicada sem plasminogénio. Estas duas informações são suficientes para concluir que a enzima BK não actua pela activação do plasminogénio, mas sim apenas pela degradação directa da fibrina. Já a urokinase em combinação com o plasminogénio, produziu um halo muito maior, indicando que a degradação foi conduzida pela plasmina que foi activada pela urokinase.



**Figura 9:** Ensaio de activação de plasminogénio. UK – urokinase (0.071 µg); BK- fracção enzimática pura (0.072 µg); PL- Plasminogénio (2.511 µg).

## 11. Actividade Fibrinogenolítica

A actividade fibrinogenolítica foi observada através da obtenção de um gel SDS-PAGE que incluiu as amostras de fibrinogénio incubadas com a enzima BK a diferentes tempos (**Figura 10**).

Segundo (McDonagh *et al.*, 1972) o fibrinogénio é composto pelas cadeias  $\alpha$  com 64 kDa, cadeia  $\beta$  com 57 kDa e pelas cadeias  $\gamma$  com 48 kDa de peso molecular. No total são duas cadeias  $\alpha$ , uma  $\beta$  e dois dímeros de cadeias  $\gamma$ , obtendo um peso molecular total de 338 kDa.

Como se pode observar, logo após a mistura da enzima com o substrato ocorreu a degradação das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogénio (FG), desaparecendo por completo a cadeia  $\beta$  e resultando no aparecimento de um novo perfil de bandas de degradação que ficou quase definido aos 0 minutos de tempo de incubação.

À medida que o tempo de incubação aumenta, verificamos que o padrão de degradação se repete, no entanto, nota-se um certo escurecimento das bandas, indicando maior degradação.

Para além disso uma nova banda de degradação surge logo após os 40 minutos de incubação, com um peso molecular de aproximadamente 10 kDa. O perfil de degradação ficou totalmente definido após uma incubação de 80 minutos, desaparecendo as outras duas cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  do fibrinogénio.

Por fim o perfil de degradação ficou com cinco bandas resultantes da degradação das várias cadeias do fibrinogénio. Três bandas de elevado peso molecular, uma com aproximadamente 34 kDa e outras duas que variam entre os 25 e os 30 kDa. Duas bandas de baixo peso molecular, uma com aproximadamente 18 kDa e outra com aproximadamente 10 kDa, ambas bem definidas.

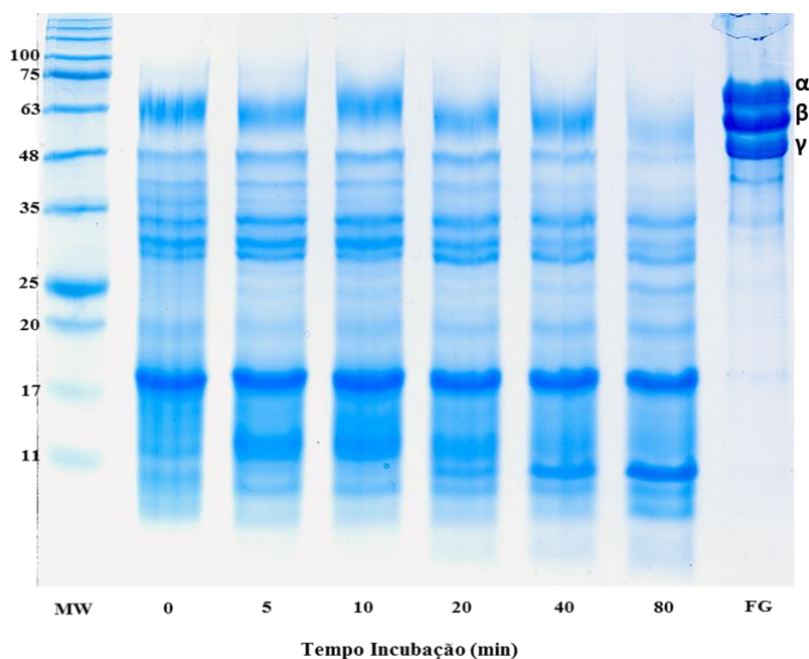


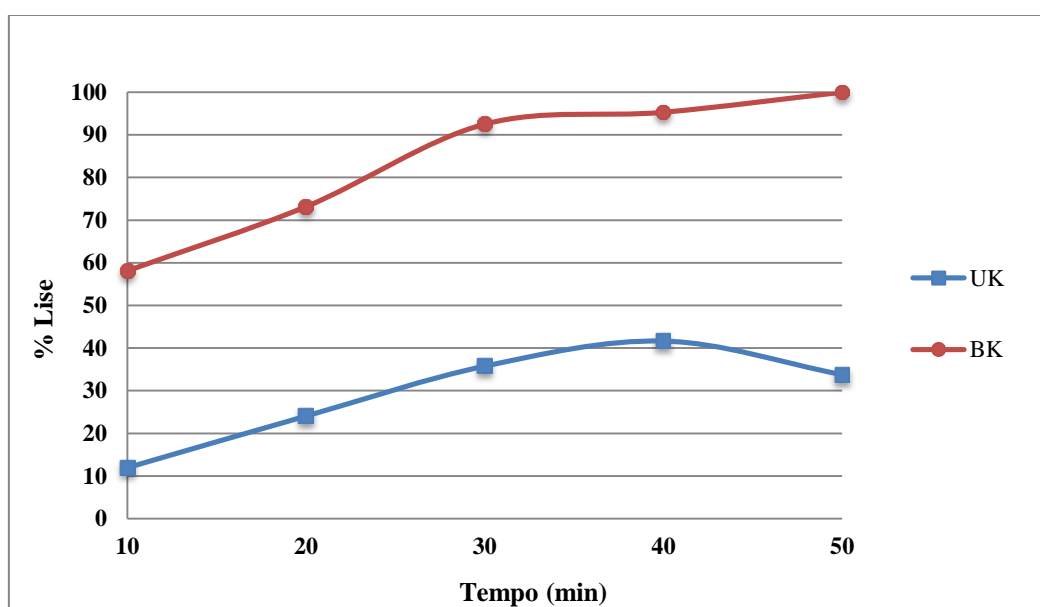
Figura 10: SDS-PAGE Fibrinogenolítico. FG- Fibrinogénio. Mix FG-Enzima (300:1) aplicado com diferentes períodos de incubação.

## 12. Actividade Trombolítica *in vitro*

Neste ensaio biológico foi possível avaliar a actividade trombolítica da enzima BK pela determinação da percentagem de lise de micro coágulos sanguíneos *in vitro*. Através da análise da absorvância de alíquotas retiradas da mistura da solução tampão com o micro coágulo e do tamanho dos respectivos fragmentos, foi possível quantificar ao longo do tempo a capacidade da enzima em degradar os coágulos.

A percentagem de lise foi estabelecida através da leitura da absorvância a 550 nm de alíquotas que contém hemácias que se destacaram do coágulo à medida que este é degradado pela enzima.

Analisando os resultados obtidos no **gráfico 13**, verificamos que a percentagem de lise da enzima BK aumenta significativamente ao longo do tempo, ultrapassando os 90 % de lise após 30 minutos de tempo de incubação. Este resultado torna bastante evidente que esta enzima possui uma óptima capacidade para degradar coágulos sanguíneos ao fim de poucos minutos. Aos 50 minutos de incubação a lise do coágulo atingiu os 100%. No entanto, o mesmo não se verificou com a urokinase de forma tão significativa, em que a lise do coágulo apenas atingiu um máximo de 40% durante o período total do ensaio.



**Gráfico 13:** Percentagem de lise do coágulo sanguíneo baseado na leitura da absorvância (550 nm) de alíquotas retiradas de cada mistura ao longo do tempo de incubação.

Observa-se os mesmos resultados quando analisamos o tamanho dos micro coágulos após cada período de incubação (**Figura 11**). No caso da enzima NK, após 20 minutos existe uma grande redução do tamanho do coágulo e como se tinha verificado anteriormente, também neste caso, o coágulo é completamente digerido entre os 40 e 50 minutos de tempo de incubação. Relativamente à urokinase, não foi possível detectar alterações no tamanho do fragmento de sangue coagulado como se detectou através da leitura de absorvância das respectivas alíquotas. O mesmo se verificou no controlo negativo, no entanto como se trata de um controlo, não foi aplicada amostra enzimática e portanto não ocorreu digestão/lise do coágulo.

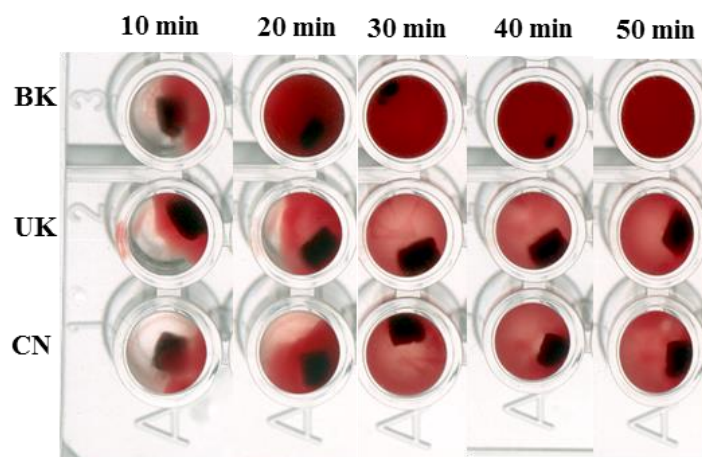


Figura 11: Microplaca com a digestão enzimática dos coágulos sanguíneos ao longo do período de incubação. BK (2.295  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); UK (2.532  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); CN – controlo negativo com 0.1 M solução tampão fosfato salino.

### 13. Influência no tempo de coagulação e lise do coágulo plasmático

O ensaio do tempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) permite a determinação do tempo de coagulação do plasma sanguíneo. Nesta tese incluiu-se a enzima BK a este ensaio TTPa, para avaliar o efeito sobre o tempo de coagulação e posteriormente a sua acção sobre o coágulo plasmático.

A enzima foi aplicada neste ensaio de diferentes maneiras (**Figura 12**), na primeira situação (A1), a enzima BK foi aplicada após a formação do coágulo, ou seja, após a determinação do tempo de coagulação. O tempo de coagulação foi de 39 segundos e não se verificou alterações no coágulo ao longo do período de incubação. Na segunda situação (A2), o objectivo foi avaliar o efeito da enzima sobre o tempo de coagulação, e para isso a enzima BK foi aplicada no início do ensaio, actuando durante o processo de coagulação. Verificou-se que o tempo de coagulação foi de 37,6 segundos, o que indica não ter influenciado a coagulação. No entanto o coágulo plasmático sofreu algumas alterações na sua forma e tamanho ao longo do período de incubação, atingindo menor dimensão após os 75 minutos de incubação.

Na terceira situação, não foi adicionado o activador da coagulação APTT e o tempo de coagulação foi superior a 120 segundos, no entanto, apesar da enzima BK ter sido adicionada nesta situação, o facto do tempo de coagulação ser anormal deve-se à ausência do activador, não permitindo tirar conclusões quanto à influencia/acção sobre o tempo de coagulação. No entanto a coagulação ocorreu e não houve alterações no tamanho ou forma do coágulo plasmático ao longo do período de incubação. É de salientar que a quantidade de plasma sanguíneo adicionado nesta situação foi o dobro comparativamente com as outras duas situações, apresentando por isso um coágulo plasmático mais consistente e estável.

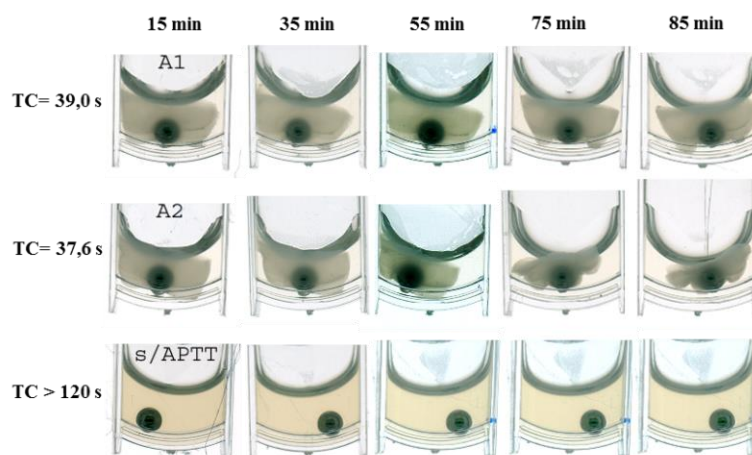


Figura 12: Tempo de coagulação e lise do coágulo plasmático ao longo do período de incubação. A1 – Amostra enzimática aplicada após coagulação; A2 – Amostra enzimática aplicada durante coagulação; s/APTT-coagulação sem activador APTT; TC- Tempo de coagulação.

Relativamente ao método que permite determinar o tempo de lise da euglobulina, como é mais sensível, pode ser usado como um ensaio mais adequado para avaliar o efeito/influência da enzima BK sobre o tempo de coagulação ou sobre o tempo de lise. Neste caso é usado uma fracção de euglobulina extraída a partir do plasma sanguíneo que apenas necessita da adição de trombina para ocorrer a coagulação, estando presente todos os elementos proteicos da via da coagulação e da fibrinólise na amostra que é analisada através da leitura de absorvância num leitor de microplacas. Neste ensaio ocorre os dois processos fisiológicos, primeiro a coagulação e depois passado um determinado tempo ocorre a fibrinólise, dando-se a destruição do coágulo.

No **gráfico 14**, temos o mesmo ensaio a decorrer em diferentes situações de aplicação da enzima BK. No controlo positivo o ensaio foi realizado em condições normais sem a adição da enzima BK e corresponde ao tempo de lise da euglobulina de um individuo normal. O controlo negativo apenas contém fracção de euglobulina e não foi adicionado a trombina.

Na situação designada por BK do gráfico (linha do gráfico a castanho) a enzima BK foi aplicada no início do ensaio e verificou-se que não houve registo do aumento de absorvância e portanto não chegou a ocorrer a formação do coágulo de euglobulina, apesar de neste caso ter sido aplicada a trombina, o padrão foi semelhante ao controlo negativo.

Na situação designada por BK 18 min (linha do gráfico a vermelho), a enzima BK foi aplicada aos 18 minutos do ensaio e verificou-se que houve registo do aumento de absorvância, havendo a formação do coágulo, no entanto após os 18 minutos houve um decréscimo acentuado na leitura de absorvância, que indica a lise do coágulo de euglobulina. Nesta situação ocorreu a coagulação mas após a aplicação da enzima ocorreu uma grande redução do tempo de lise da euglobulina. Estes resultados confirmam uma vez mais a actividade fibrinolítica desta

enzima, que actua sobre as fibras de fibrina impedindo a formação do coágulo ou reduzindo o tempo de lise do coágulo de euglobulina. É de salientar que neste método da euglobulina, ao contrário do método APTT, a quantidade de fibrina envolvida ou que é produzida encontra-se em quantidades muito menores, permitindo uma maior sensibilidade ao ensaio, pois a proporção de enzima e substrato está mais equilibrada.

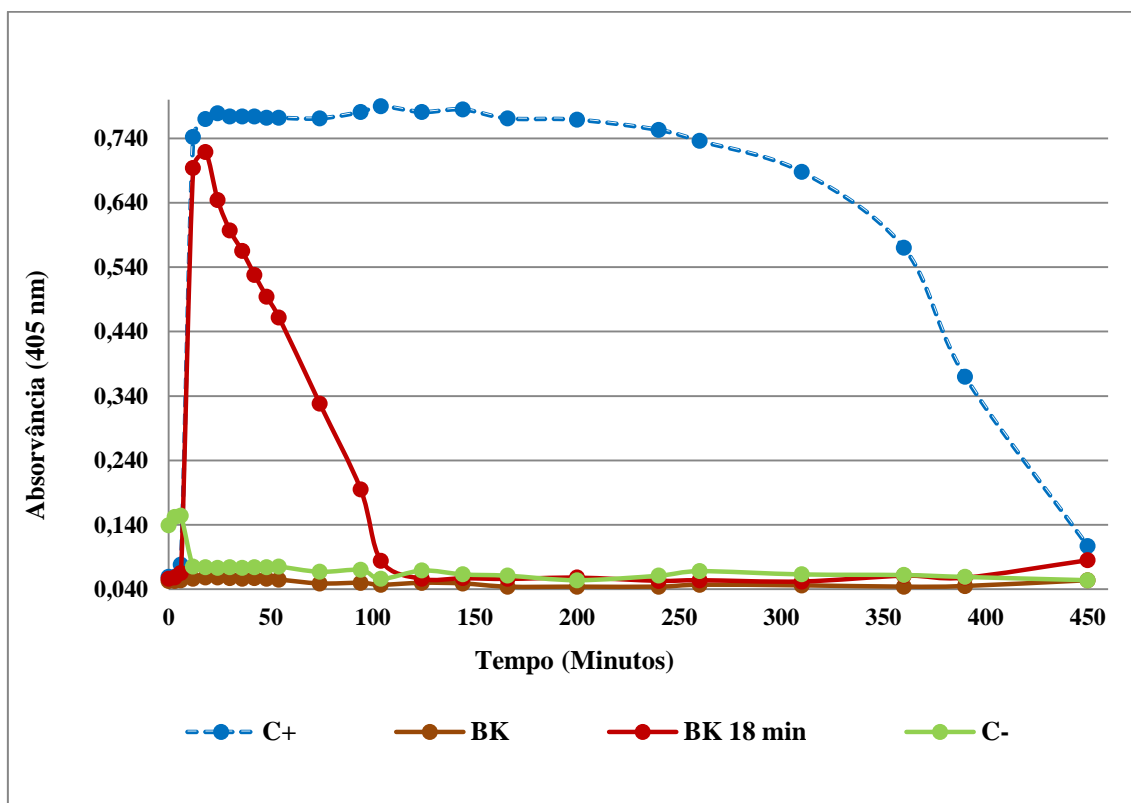


Gráfico 14: Tempo de lise da Euglobulina em diferentes situações. Situação normal (C+); Aplicação de BK no início do ensaio (BK); Aplicação de BK aos 18 minutos (BK 18 min); Ensaio sem trombina (C-).

## 14. Ensaio de citotoxicidade da fracção enzimática pura

Como se trata de uma enzima com grande potencial para o tratamento clínico de doenças ou distúrbios da hemostasia, foi necessário averiguar o seu nível de toxicidade celular, através de dois ensaios. O ensaio de citotoxicidade MTT com células vero e o ensaio hemolítico.

Observando os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade MTT (Gráfico 15), quanto à azida de sódio que foi usada como controlo positivo por ser altamente toxica para as células, verificou-se que quando aplicada numa concentração final de 0.5 mM, provocou uma taxa de mortalidade na ordem dos 80%. Analisando os resultados obtidos no caso da enzima BK, verificou-se que a taxa de mortalidade provocada é baixa ou quase residual para todas as

concentrações em que esta foi aplicada, ou seja, foi obtido uma taxa de mortalidade inferior a 10%.

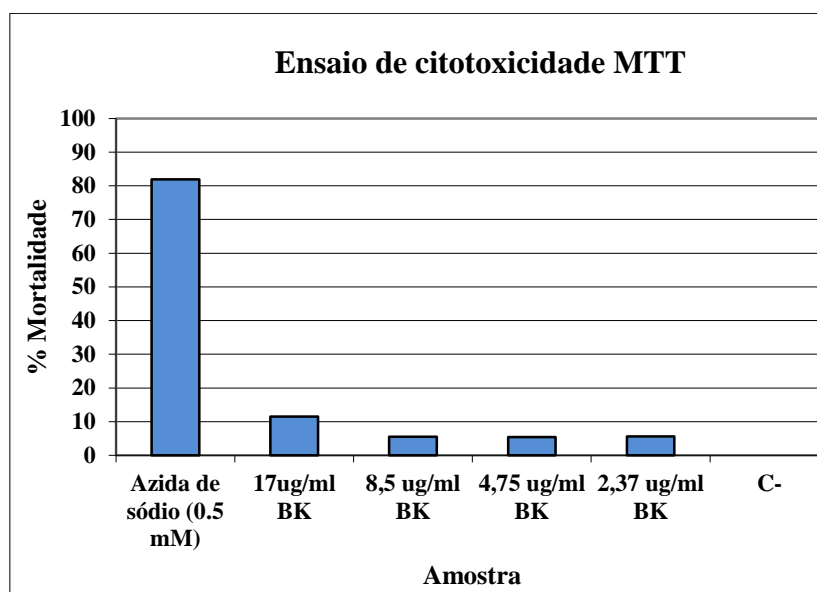


Gráfico 15: Ensaio de citotoxicidade MTT com células vero. Azida de sódio (C+);

Relativamente ao ensaio hemolítico (**Gráfico 16**), foi possível determinar a % de hemócitos através da leitura de absorvância das amostras ao longo do tempo. Verificou-se que no caso do controlo positivo, a % de hemócitos manteve-se baixa desde o início do ensaio, indicando a lise da maior parte dos hemócitos existentes na amostra. O controlo positivo usado foi H<sub>2</sub>O MiliQ, o que provoca a lise dos hemócitos em poucos segundos através do movimento osmótico da água para o interior das células. Quanto à amostra de hemócitos com a enzima BK, verificou-se que a % de hemócitos permaneceu elevada ao longo de todo o ensaio, seguindo o mesmo padrão do controlo negativo composto por solução salina isotónica, indicando que a enzima BK não provoca a lise das hemácias.

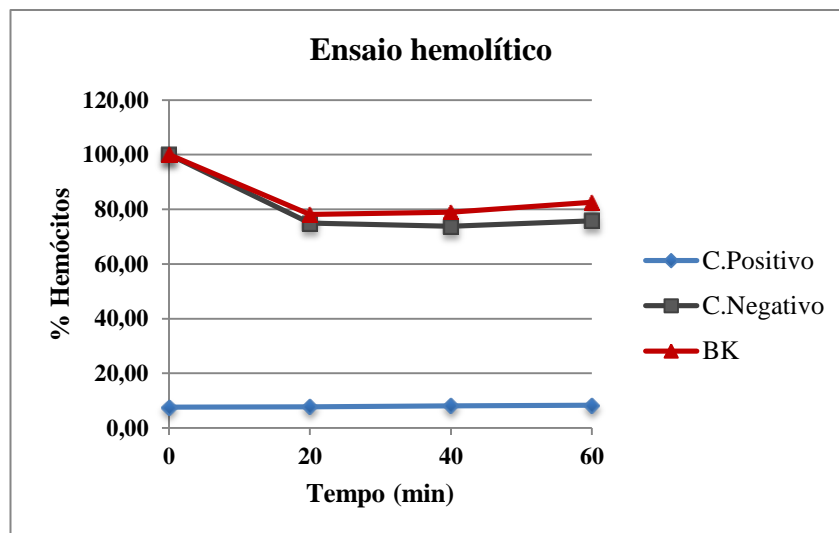


Gráfico 16: Ensaio hemolítico da fracção enzimática pura. Solução NaCl 0.9% (C-); H<sub>2</sub>O MiliQ (C+);

## IV - Discussão

### **Screening de microrganismos produtores de enzimas fibrinolíticas**

Foram seleccionados 24 isolados de *S. Miguel* pertencentes ao banco de *Bacillus* spp. do grupo de entomoparasitologia e o nematode *Steinernema Carpocapsae* pertencente à colecção entomopatogénica da Universidade dos Açores, para a realização de um *screening* de actividades proteolíticas, nomeadamente de acção sobre substratos de fibrina.

Sabe-se que os 24 isolados bacterianos seleccionados para esta pesquisa, são grandes produtores de proteases, pois estas estirpes bacterianas já foram anteriormente caracterizadas e que o nematode *Steinernema Carpocapsae* produz uma serina protéase, designada por Sc-SP-1, que é expressa no nematode durante a sua fase parasitária e que está envolvida no processo de invasão através da parede do intestino do insecto, sendo muito eficiente na degradação da lâmina basal e da membrana peritrófica. Para além disso, a análise bioquímica e da sequência da proteína revelou que esta pertence à família das quimotripsinas (Simões, comunicação pessoal).

Destes microrganismos que participaram na pesquisa de actividades, foi encontrado seis estirpes de bactérias produtoras de enzimas com capacidade de degradar fibrina. Estes isolados bacterianos foram o S150c, S127e, S147e, S157e, S159c e S126e. Verificou-se também que o nematode produz enzimas com capacidade fibrinolítica. Quando se fez a pesquisa de

actividades, foi feito duas placas de fibrina com e sem plasminogénio, em que se testou as actividades em paralelo. Não existiu diferenças significativas na actividade produzida pelas amostras entre ambas as placas. É de referir que a concentração final de plasminogénio na placa de agarose foi de 0.06 U/ml, o que constitui uma limitação uma vez que a concentração enzimática deverá ser maior para produzir halos de digestão visíveis. Assim a actividade obtida em ambas as placas foi semelhante e não se encontrou nenhuma amostra que actua-se sobre a fibrina pela activação do plasminogénio presente na mistura.

O isolado S127e foi o que apresentou maior actividade enzimática, tanto nos ensaios com os substratos generalistas de caseína e azoalbumina, como nos ensaios em placa de fibrina. Através do ensaio em placa de fibrina, foi possível estimar a actividade das amostras a partir das unidades de actividade da urokinase comercial. A amostra S127e tem 4680 unidades de actividade por ml, o que corresponde a metade da actividade da urokinase que se encontra no seu estado puro, indicando que a amostra S127e é composta por uma quantidade significativa de enzima fibrinolítica com uma boa actividade.

Para além disso, através da análise das amostras que foram aplicadas num zimograma suplementado com fibrina, verificou-se que a amostra S127e ao contrário das restantes, apresentou uma banda de digestão bem definida com cerca de 40 kDa de tamanho molecular, indicando a presença de uma enzima com elevada actividade fibrinolítica e confirmando os resultados dos ensaios em placa de fibrina. A estratégia desta técnica é sobretudo usada com o objectivo de detectar actividade enzimática ou analisar um grande número de componentes activos num sistema multienzimático. No entanto, já foi provado através de um zimograma convencional, que a determinação do peso molecular de algumas proteases pode não corresponder ao tamanho molecular real, devido à diminuição da mobilidade que as proteínas sofrem num gel de acrilamida copolimerizado com um determinado substrato (Hummel *et al.*, 1996).

Foi seleccionado o isolado S127e para dar continuidade ao estudo desta tese, pelo facto de ter sido a estirpe que produziu a maior actividade fibrinolítica. As etapas que envolveram este estudo foram a purificação da enzima fibrinolítica, caracterização bioquímica, determinação da actividade específica e por fim a realização de vários ensaios biológicos.

## **Identificação do grupo genético dos isolados**

Com o objectivo da identificação do grupo genético de cada um dos isolados, obteve-se os perfis de restrição ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) do gene 16S rRNA com a enzima AluI para os 24 isolados bacterianos. Foi possível distinguir quatro grupos

genéticos diferentes baseados no perfil de bandas de restrição obtido. Os isolados S1e, S25b, S35b, S56b e S150d pertencem ao grupo I, com um perfil característico de espécies pertencentes ao grupo *Cereus*, que contém as espécies *B. anthraci*, *B. thuringiensis* e *B. cereus*. Quanto ao Grupo II que corresponde às espécies *B. mycoides* e *B. weihenstephanesi*, pertencem os isolados S37c, S47a e S144c. Nenhuma destas estirpes pertencentes a estes dois grupos genéticos registou actividade fibrinolítica.

Relativamente ao grupo genético VII, pertencem a maior parte dos isolados cuja actividade fibrinolítica foi detectada nos ensaios de *screening*. Os isolados que fazem parte deste grupo são o S122c, S150c, S53c, S118e, S127e, S160a, S117b, S124a, S157e, S159c, S126e e S172d e correspondem às espécies *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus* e *B. amyloliquefaciens*. Neste grupo as estirpes que produziram enzimas fibrinolíticas foram S150c, S127e, S157e, S159c e S126e. Diversas estirpes das espécies *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* estão descritos em outros estudos como sendo produtores de enzimas fibrinolíticas. As estirpes DC-4 da espécie *B. amyloliquefaciens* (Peng *et al.*, 2003) e a QK02 de *B. subtilis* (Ko *et al.*, 2004) são apenas dois exemplos de estirpes isoladas a partir de alimentos tradicionais fermentados que produzem enzimas fibrinolíticas.

O grupo genético XV contém os isolados S147e, S191d e S192b, cujas espécies correspondentes ao perfil de restrição ARDRA são desconhecidas. A estirpe S147e foi o único do seu grupo em que se detectou enzimas fibrinolíticas. A obtenção de perfis ARDRA com base no protocolo descrito em (Wu *et al.*, 2006), utilizando os iniciadores específicos de *Bacillus* para amplificação do gene 16S juntamente com a enzima de restrição AluI, foi bastante adequada para diferenciar os vários grupos de *Bacillus*.

Para além da determinação do grupo genético de cada um dos isolados, fez-se a identificação do isolado S127e com base na análise da sequência do gene 16S rRNA através do alinhamento com sequências da base de dados do NCBI e verificou-se que existe uma grande identidade com as espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*, com uma percentagem de identidade superior a 99% para ambas as espécies. No entanto, como é discutido mais adiante, a identificação da enzima fibrinolítica por Ms/Ms, determinará a qual das duas espécies pertence o isolado S127e.

### **Purificação da enzima fibrinolítica do isolado S127e**

Durante o processo de purificação, verificou-se que a enzima de interesse tem um ponto isoeléctrico alcalino (superior a 8) uma vez que saiu na exclusão da cromatografia de troca aniónica. A pH 8, a proteína de interesse estava carregada positivamente e saiu na exclusão da

cromatografia, sendo que as restantes proteínas saíram à medida que o gradiente de concentração do eluente aumentou.

Depois as fracções correspondentes ao pico da exclusão foram submetidas a uma cromatografia de separação por tamanho molecular (Superdex 75) e obtivemos um pico com boa resolução e que corresponde às fracções com actividade enzimática usando o substrato cromogénico Suc-AAPF-pNa. Por fim procedeu-se a uma cromatografia de troca catiónica de modo a separar outras proteínas com um ponto isoeléctrico alcalino semelhante à enzima de interesse que se pretende purificar. Obteve-se a fracção correspondente ao pico máximo que contém a proteína de interesse, que a pH 6, está carregada positivamente e ficou retida na fase estacionária com uma força iónica moderada e saiu assim que o gradiente do eluente aumentou.

Foi possível averiguar a crescente purificação da enzima ao longo das várias separações cromatográficas, através da aplicação das fracções obtidas de cada uma delas em um gel de SDS-PAGE. Verificou-se que a amostra inicial de sobrenadante de meio de cultura e a fracção obtida em HQ apresentavam um padrão de bandas ainda complexo, indicando a presença de muitas proteínas com diversos pesos moleculares e portanto baixo nível de purificação. Depois a fracção obtida na cromatografia de exclusão molecular (superdex 75) já apresentava um padrão de bandas mais reduzido e simples, no entanto ainda com várias proteínas por excluir.

Por fim analisando a amostra HS resultante da cromatografia de troca catiónica, verificamos a existência de uma banda proteica bem definida e visível na ordem dos 27 kDa, indicando um elevado grau de purificação, no entanto com a existência de uma banda muito ténue com aproximadamente 48 kDa indicando que esta fracção enzimática não se encontrava totalmente pura, podendo ter resíduos de outra proteína. Foi necessário recorrer a uma cromatografia de troca catiónica com maior força iónica (MonoS) e que permitiu uma melhor resolução dos picos (melhor separação das proteínas), obtendo uma única banda no gel SDS-PAGE com aproximadamente 27 kDa e que corresponde à enzima fibrinolítica purificada. A actividade específica aumentou ao longo das várias fracções obtidas e o factor purificação determinado foi de 1114, indicando um elevado grau de purificação da enzima fibrinolítica.

## **Identificação da enzima fibrinolítica**

A banda de 27 kDa correspondente à fracção enzimática pura foi identificada com um *score* bastante significativo, como sendo uma proteína homóloga de uma enzima fibrinolítica com um peso molecular de 27.44 kDa (nº acesso do NCBI gi|159149224) que é produzida pela estirpe ML909 de *Micrococcus luteus*. Esta estirpe foi isolada a partir do meio ambiente natural

através de um *screening* em placa de agar sangue e placa de fibrina (XIAO, ZHANG e ZHANG, 2008).

Curiosamente, a enzima purificada nesta tese também apresentou uma homologia, com um *score* idêntico, para uma enzima designada por *lytic enzyme L27* (nº acesso do NCBI gi|3986320) que é produzida por um *Bacillus subtilis*. Esta informação confirma que o isolado S127e, cuja análise do gene 16S rRNA apresentou uma homologia de 99% com as espécies de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, pertence ao grupo do *Bacillus subtilis*. A enzima L27 está registada no NCBI como sendo codificada pelo gene YS-1005 de *Bacillus subtilis*. Os autores que identificaram esta enzima pela primeira vez tinham como objectivo a pesquisa de uma enzima com capacidade lítica contra bactérias cariogénicas, nomeadamente da espécie *Streptococcus mutans*. Identificaram uma estirpe de *Bacillus licheniformis* que secreta dois tipos de enzimas, que purificaram e caracterizaram bioquimicamente. Estas duas enzimas, designadas por L27 e L45, apresentam um peso molecular de 27 kDa e 45 kDa, respectivamente. As condições óptimas de funcionamento destas enzimas revelaram ser a um pH 8 e a uma temperatura de 37 °C. Tanto a L27 como a L45 são capazes de digerir a ligação peptídica entre o aminoácido L-Ala e D-Glu do peptidoglicano que constitui a parede celular da bactéria *Streptococcus mutans*. Os autores sugerem ainda que estas enzimas têm potencial para serem usadas como produto de cuidado dental, devido à sua alta especificidade bacteriolítica contra as estirpes de *Streptococcus mutans*, prevenindo deste modo o aparecimento de cáries dentárias (KIM *et al.*, 1999)

## **Caracterização bioquímica e determinação da actividade da enzima**

A caracterização bioquímica da enzima BK envolveu a determinação das condições óptimas de pH e temperatura, o efeito dos diversos iões/solventes e dos inibidores na actividade enzimática e a determinação dos substratos específicos da enzima. Relativamente à actividade enzimática, determinou-se a capacidade fibrinolítica e fibrinogenolítica da fracção enzimática pura. A capacidade de activação do plasminogénio também foi estudada.

A temperatura óptima de funcionamento da enzima BK é de aproximadamente 48 °C, no entanto também apresenta boa actividade a uma temperatura de 37°C que é próxima da temperatura fisiológica do organismo humano. A enzima apresenta uma actividade máxima em meios neutros, com um pH óptimo de 7, ou seja, muito próximo do pH do sangue humano, indicando que esta enzima apresentará boa actividade caso seja aplicada por injeção intravenosa. Relativamente ao efeitos dos iões na actividade da enzima, verificou-se que os iões MgCl<sub>2</sub> e o CaCl, contribuem com o aumento da actividade, no entanto o cofactor ideal da

enzima é o magnésio, uma vez que este atinge um maior incremento de actividade, enquanto o cálcio apenas contribui com um ligeiro incremento da actividade. É de salientar que a enzima não é dependente destes iões para apresentar boa actividade sobre o substrato de fibrina, no entanto na presença de magnésio a sua actividade quase duplica.

Quanto ao ensaio com inibidores, verificou-se que a Quimostatina e o PMSF foram os que obtiveram maior percentagem de inibição sobre a enzima BK. A Quimostatina é um inibidor forte de muitas proteases, nomeadamente a quimotripsina, serina-proteases do tipo quimotripsina, quimases e as cisteínas proteases lisossomais como as catpsinas B, H e L. Já o PMSF é um inibidor de grande espectro de acção sobre serina-proteases. Também sabe-se que inibe algumas cisteínas proteases como a papaína. Os resultados destes dois inibidores por si só são bastante informativos quanto à enzima BK, indicando que esta pertence à família das serina-proteases do tipo quimotripsina.

Relativamente ao ensaio com os substratos específicos, verificou-se que a enzima apenas degradou dois substratos, apresentando uma maior especificidade com o substrato Suc-AAPF-pNa e logo a seguir com menor actividade com o substrato Suc-AAPM-pNa. Estes dois substratos são específicos para quimotripsinas e catpsinas G, confirmando uma vez mais que a enzima purificada em questão pertence à família das serina-proteases do tipo quimotripsina.

As serina-proteases são a classe de proteases mais bem estudadas. Este grupo de proteases inclui várias enzimas, distribuídas por muitas famílias, como as proteases do aparelho digestivo (tripsina e quimotripsina), enzimas fibrinolíticas, enzimas envolvidas na coagulação do sangue e subtilisinas bacterianas. As serina-proteases são caracterizadas pela presença de uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos do ácido aspártico (electrófilo), serina (nucleófilo) e histidina (base). A serina actua como um resíduo muito reactivo (nucleófilo) que forma uma ligação covalente com o substrato. A actividade catalítica óptima destas enzimas situa-se a valores de pH entre 7 e 9 (Barrett *et al.*, 2013)

Através do ensaio em placa de fibrina foi possível estimar a actividade fibrinolítica da enzima BK a partir da urokinase comercial. Ambas as enzimas foram aplicadas na placa de fibrina em concentrações equivalentes, de modo a ser possível comparar e estimar actividades. O cálculo da constante de actividade permitiu estimar as unidades de actividade da enzima de interesse a partir da actividade conhecida da urokinase comercial. As constantes de actividade obtidas para ambas enzimas foram muito idênticas e a actividade enzimática obtida para a enzima BK foi de 4 U/ $\mu$ g.

Pela análise dos resultados obtidos no ensaio de activação do plasminogénio, conclui-se que a enzima BK não é capaz de degradar a fibrina de forma indirecta pela activação do

plasminogénio, à semelhança do que acontece com a urokinase e streptokinase que são activadores do plasminogénio (PA). Assim a enzima BK é uma enzima do tipo plasmina, que apenas actua degradando directamente as fibras de fibrina. Outro exemplo de uma enzima deste tipo é a nattokinase (Kotb, 2013).

A actividade fibrinogenolítica da enzima BK também foi determinada, e o objectivo foi verificar se a enzima é capaz de degradar as várias cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogénio (FG). A enzima BK degradou por completo a cadeia  $\beta$  logo nos primeiros minutos de incubação, e as restantes cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  foram completamente degradadas após os 80 minutos de reacção, desaparecendo as bandas correspondentes do gel SDS-PAGE. Conclui-se que a enzima BK é capaz de degradar com facilidade o fibrinogénio, que se encontra no seu estado solúvel, no entanto a sua capacidade de degradação de fibras insolúveis de fibrina é elevada e pode desafiar a actividade de outras enzimas fibrinolíticas que foram descobertas. É de salientar que é desejável maior capacidade fibrinolítica do que fibrinogenolítica, pois se na aplicação da enzima por via intravenosa, a concentração de fibrinogénio no sangue atingir valores inferiores ao nível normal, o paciente pode sofrer de problemas hemorrágicos, uma vez que não ocorre a formação de fibras insolúveis de fibrina que fazem parte dos coágulos sanguíneos. Assim o desejável é que a enzima não interfere tanto com o fibrinogénio, mas sim sobre o coágulo após a sua formação, de modo a reduzir o tempo de lise do mesmo. Para estudar o comportamento da enzima em condições fisiológicas, será necessário recorrer a ensaios *in vivo* numa fase mais avançada desta investigação.

### **Ensaio biológico *in vitro***

Recorreu-se a ensaios biológicos *in vitro* para avaliar o comportamento da enzima BK perante a presença de outros elementos que fazem parte dos diversos tecidos dos organismos vivos. Para isso recorreu-se ao ensaio de actividade trombolítica *in vitro*, que estuda a capacidade da enzima degradar os coágulos sanguíneos com todos os seus constituintes presentes e aos ensaios que permitem avaliar a influência da enzima sobre os processos de coagulação e fibrinólise que são regulados por um grande conjunto de elementos constituintes do sangue. Para além disso determinou-se a toxicidade da enzima sobre as células vero e os hemócitos.

Após a análise dos resultados obtidos no ensaio de actividade trombolítica, verificou-se que a enzima BK foi capaz de degradar o coágulo sanguíneo completamente após 50 minutos de tempo de incubação. O mesmo não se verificou com a urokinase que foi aplicada nas mesmas condições que a enzima BK, em que a lise do coágulo apenas atingiu um valor máximo de 40%

durante o período total do ensaio. Estes resultados demonstram que a enzima BK apresenta uma elevada capacidade trombolítica para além da boa actividade fibrinolítica que possui, no entanto a urokinase não apresentou um comportamento semelhante, apresentando uma maior capacidade fibrinolítica do que trombolítica.

É de salientar que a conformação tridimensional e a disposição das fibras de fibrina num coágulo sanguíneo é diferente e mais complexa do que a configuração apresentada numa placa de agarose composta por apenas fibrina insolúvel. No final da cascata de coagulação que culmina com a activação da trombina que converte o fibrinogénio em fibrina insolúvel (fibras), ocorre a activação de outros factores importantes, nomeadamente o factor XIII. Este factor quando activado, promove ligações cruzadas (*cross-linking*) entre as cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  das fibras de fibrina, tornando o coágulo mais resistente à actividade proteolítica e à disrupção mecânica. A presença deste factor XIII é altamente importante, uma vez que as hemorragias são frequentes em pacientes com défice ou ausência deste factor, pois as fibras de fibrina precisam de ser estabilizadas de modo a formar uma estrutura rígida e elástica capaz de impedir perdas de sangue no sistema circulatório (Standeven *et al.*, 2007). Possivelmente será por isso e pelo facto da urokinase apresentar baixa afinidade e especificidade para com a fibrina e de actuar preferencialmente pela activação do plasminogénio, que não foi capaz de degradar por completo o coágulo sanguíneo composto por fibras estabilizadas pelo factor XIIIa. Curiosamente a enzima BK para além da boa actividade fibrinolítica que apresentou, também mostrou ser bastante eficiente em degradar o coágulo sanguíneo.

Outro ensaio importante foi o tempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) que permite a determinação do tempo de coagulação do plasma sanguíneo. Neste ensaio incluiu-se a enzima BK, para avaliar o efeito sobre o tempo de coagulação e posteriormente a sua acção sobre o coágulo plasmático. Após a análise dos resultados, verificou-se que a enzima BK não alterou o tempo de coagulação normal, mas posteriormente provocou uma ligeira degradação do coágulo plasmático.

Com estes resultados concluiu-se que a enzima BK não interfere com o processo de coagulação, à semelhança do que acontece com outros agentes anticoagulantes, como a Varfarina que inibe os factores de coagulação dependentes de vitamina K, Rivaroxabana e Apixabana que inibem o factor Xa e o Dabigatran que inibe directamente a trombina (Goel e Srivathsan, 2012).

Também foi possível avaliar o efeito da enzima no tempo de lise do coágulo de euglobulina. Neste caso, o que está a ser avaliado é o tempo que decorre desde o coágulo formado até à sua completa lise, ou seja, este ensaio determina a capacidade do sistema de fibrinólise. A enzima foi aplicada em duas situações diferentes. Na primeira situação em que foi

aplicada no início do ensaio, verificou-se que não chegou a ocorrer formação do coágulo. Conclui-se que a enzima BK degradou a fibrina à medida que esta estava a ser formada pela trombina e não chegou a haver formação do coágulo de euglobulina. Na segunda situação, esta foi aplicada ao minuto 18 e verificou-se que o tempo de lise da euglobulina reduziu drasticamente, indicando que a enzima BK degradou por completo o coágulo de euglobulina. É de salientar que neste método da euglobulina, ao contrário do método APTT, a quantidade de fibrina envolvida ou que é produzida encontra-se em quantidades muito menores, permitindo uma maior sensibilidade ao ensaio, pois a proporção de enzima e substrato está mais equilibrada. Estes resultados confirmam uma vez mais a actividade fibrinolítica desta enzima, que actua sobre as fibras de fibrina impedindo a formação do coágulo ou reduzindo o tempo de lise do coágulo de euglobulina, indicando que esta é uma enzima do tipo plasmina.

Como se trata de uma enzima com grande potencial para o tratamento clínico de doenças ou distúrbios da hemostasia, foi necessário averiguar o seu nível de toxicidade celular, através de dois ensaios. O ensaio de citotoxicidade MTT com células vero e o ensaio hemolítico. Em ambos os ensaios, verificou-se que a taxa de mortalidade provocada tanto nas células vero como nas hemácias foi baixa ou quase nula para todas as concentrações em que a enzima foi aplicada. Estes dados sugerem que a enzima BK não apresenta toxicidade celular, o que abre possibilidade de num futuro poder ser usada como um fármaco no tratamento clínico de diversas doenças da hemostasia, no entanto é necessário recorrer a ensaios de toxicidade *in vivo*, que por envolverem um maior número de factores, poderão indicar com um maior grau de certeza o nível de toxicidade que esta enzima pode ou não apresentar.

## V – Considerações Finais

Nesta tese foi identificado um isolado açoriano pertencente à espécie *Bacillus subtilis* que produz uma enzima com actividade fibrinolítica. Esta proteína apresenta uma grande homologia com uma enzima fibrinolítica de outra espécie, nomeadamente *Micrococcus luteus* e com uma enzima bacteriolítica (*lytic enzyme L27*) de *Bacillus subtilis*. Os ensaios biológicos permitiram demonstrar que esta enzima, à qual designamos por *Bacillus-kinase* (BK), possui grande capacidade fibrinolítica e trombolítica, desafiando outras enzimas conhecidas com o mesmo tipo de actividade. Em trabalhos futuros seria importante identificar o gene codificante desta enzima BK e prosseguir com ensaios de actividade e de toxicidade *in vivo*, de modo avaliar a viabilidade desta enzima ser usada como um fármaco para o tratamento clínico de doenças da hemostasia.

## VI – Bibliografia

- EL-AASSAR, S. A.; EL-BADRY, H. M.; ABDEL-FATTAH, A. F. - The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9. **Appl Microbiol Biotechnol.** . ISSN 0175-7598 (Print) 0175-7598 (Linking). 33:1 (1990) 26–30.
- AHN, Mi Young *et al.* - Purification and characterization of a serine protease (CPM-2) with fibrinolytic activity from the dung beetles. **Archives of pharmacal research.** . ISSN 0253-6269. 28:7 (2005) 816–822.
- ASTRUP, Tage; MÜLLERTZ, Sten - The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** . ISSN 0003-9861. 40:2 (1952) 346–351. doi: 10.1016/0003-9861(52)90121-5.
- BARRETT, Alan J. *et al.* - Introduction. Em SALVESEN, NEIL D. RAWLINGSGUY (Ed.) - **Handbook of Proteolytic Enzymes** [Em linha]. [S.l.] : Academic Press, 2013 [Consult. 21 out. 2014]. Disponível em WWW:<URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123822192008383>. ISBN 978-0-12-382219-2. p. li–liv.
- BATOMUNKUEVA, B. P.; EGOROV, N. S. - Isolation, Purification, and Resolution of the Extracellular Proteinase Complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with Fibrinolytic and Anticoagulant Activities. **MICROBIOLOGY.** 70:5 (2001) 519–522.
- BLANN, Andrew D.; LANDRAY, Martin J.; LIP, Gregory Y. H. - An overview of antithrombotic therapy. **BMJ.** . ISSN 0959-8138, 1468-5833. 325:7367 (2002) 762–765. doi: 10.1136/bmj.325.7367.762.
- BOMBELI, T.; SPAHN, D. R. - Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. **Br J Anaesth.** . ISSN 0007-0912 (Print) 0007-0912 (Linking). 93:2 (2004) 275–87. doi: 10.1093/bja/ae174.
- BOOTH, N. A. *et al.* - A new life-long hemorrhagic disorder due to excess plasminogen activator. **Blood.** . ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). 61:2 (1983) 267–75.
- BORTOLETO, R. K. *et al.* - Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon.** . ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). 40:9 (2002) 1307–12.
- BRANDT, J. T. - Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. **Arch Pathol Lab Med.** . ISSN 0003-9985 (Print) 0003-9985 (Linking). 126:11 (2002) 1376–81. doi: 10.1043/0003-9985(2002)126<1376:PATTPA>2.0.CO;2.
- BRUMMEL, K. E. *et al.* - Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. **Blood.** . ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). 100:1 (2002) 148–52.
- BUTENAS, S. *et al.* - Models of blood coagulation. **Blood Coagul Fibrinolysis.** . ISSN 0957-5235 (Print) 0957-5235 (Linking). 11 Suppl 1:2000) S9–13.
- CARAMELLI, P. *et al.* - Neurological complications after thrombolytic treatment for acute myocardial infarction: emphasis on unprecedented manifestations. **Acta Neurol Scand.** . ISSN 0001-6314 (Print) 0001-6314 (Linking). 85:5 (1992) 331–3.
- CERA, Enrico DI - Serine Proteases. **IUBMB life.** . ISSN 1521-6543. 61:5 (2009) 510–515. doi: 10.1002/iub.186.
- CHANG, C. T. *et al.* - Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. **J Agric Food Chem.** . ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561 (Linking). 48:8 (2000) 3210–6.

- CHEN, Renne; DOOLITTLE, Russell F. - IDENTIFICATION OF THE POLYPEPTIDE CHAINS INVOLVED IN THE CROSS-LINKING OF FIBRIN\*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 0027-8424. 63:2 (1969) 420–427.
- CHITTE, R. R.; DEY, S. - Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. **Lett Appl Microbiol**. . ISSN 0266-8254 (Print) 0266-8254 (Linking). 31:6 (2000) 405–10.
- CHOI, HS.; SHIN, PH. - Purification and partial characterization of a fibrinolytic protease in *Pleurotus ostreatus*. **Mycologia**. 90:4 (1998) 674–679.
- CHOI, NS. *et al.* - Purification and characterization of a new peptidase, bacillopeptidase DJ-2, having fibrinolytic activity: produced by *Bacillus* sp. DJ-2 from Doen-Jang. **Journal of microbiology and biotechnology**. 15(1):2005) 72–79.
- COLLEN, D.; LIJNEN, H. - Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. **J Thromb Haemost**. . ISSN 1538-7836. 2:4 (2004) 541–546. doi: 10.1111/j.1538-7933.2004.00645.x.
- COLLEN, D.; LIJNEN, H. R. - Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential? **Blood**. . ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). 84:3 (1994) 680–6.
- COLLET, Jean-Philippe *et al.* - The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. **Blood**. . ISSN 0006-4971. 106:12 (2005) 3824–3830. doi: 10.1182/blood-2005-05-2150.
- COUTO, L. T.; DONATO, J. L.; NUCCI, G. DE - Analysis of five streptokinase formulations using the euglobulin lysis test and the plasminogen activation assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]**. . ISSN 0100-879X. 37:12 (2004) 1889–1894. doi: /S0100-879X2004001200015.
- CUI, L. *et al.* - A novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*, a Chinese traditional medicinal mushroom. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. . ISSN 0959-3993. 24:4 (2008) 483–489. doi: 10.1007/s11274-007-9497-1.
- DEMARMELS BIASIUTTI, F. *et al.* - Is plasminogen deficiency a thrombotic risk factor? A study on 23 thrombophilic patients and their family members. **Thromb Haemost**. . ISSN 0340-6245 (Print) 0340-6245 (Linking). 80:1 (1998) 167–70.
- DIAMANDIS, M. *et al.* - Quebec platelet disorder is linked to the urokinase plasminogen activator gene (PLAU) and increases expression of the linked allele in megakaryocytes. **Blood**. . ISSN 1528-0020 (ELECTRONIC) 0006-4971 (LINKING). 113:7 (2009) 1543–6. doi: 10.1182/blood-2008-08-175216.
- DOBROVOLSKY, A. B.; TITAEVA, E. V. - The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. **Biochemistry (Mosc)**. . ISSN 0006-2979 (Print) 0006-2979 (Linking). 67:1 (2002) 99–108.
- DUFFY, Michael - Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. **Clin Chem**. . ISSN 0009-9147. 48:8 (2002) 1194–1197.
- EGOROV, NS. *et al.* - *Streptomyces spheroides* M8–2 strain—a producer of extracellular proteolytic enzyme possessing fibrinolytic and thrombolytic action. **Nauch Dokl Vyss Sk Biol Nauki**. 1:1985) 77–81.
- EGOROV, N. S.; KOCHETOV, G. A.; KHAIDAROVA, N. V. - [Isolation and properties of the fibrinolytic enzyme from the *Actinomyces thermovulgaris* cultural broth]. **Mikrobiologiya**. . ISSN 0026-3656 (Print) 0026-3656 (Linking). 45:1976) 455–9.

- FITZMAURICE, David A.; BLANN, Andrew D.; LIP, Gregory Y. H. - Bleeding risks of antithrombotic therapy. **BMJ**. . ISSN 0959-8138, 1468-5833. 325:7368 (2002) 828–831. doi: 10.1136/bmj.325.7368.828.
- FUJITA, M. *et al.* - Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. **Biochem Biophys Res Commun**. . ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). 197:3 (1993) 1340–7. doi: 10.1006/bbrc.1993.2624.
- GOEL, Ramil; SRIVATHSAN, Komandoor - Newer Oral Anticoagulant Agents: A New Era in Medicine. **Current Cardiology Reviews**. . ISSN 1573-403X. 8:2 (2012) 158–165. doi: 10.2174/157340312801784934.
- HAHN, B. S. *et al.* - Purification and characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from *Tenodera sinensis* (praying mantis). **Biochim Biophys Acta**. . ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). 1430:2 (1999) 376–86.
- HAHN, B. S. *et al.* - Purification and characterization of a plasmin-like protease from *Tenodera sinensis* (Chinese mantis). **Insect Biochem Mol Biol**. . ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748 (Linking). 31:6-7 (2001) 573–81.
- HUMMEL, Katrina M. *et al.* - Anomalous Estimation of Protease Molecular Weights Using Gelatin-Containing SDS–PAGE. **Analytical Biochemistry**. . ISSN 0003-2697. 233:1 (1996) 140–142. doi: 10.1006/abio.1996.0019.
- JEONG, YK. *et al.* - Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. **World J Microbiol Biotechnol**. 17:2001) 89–92.
- JEONG, Y. K. *et al.* - Molecular cloning and characterization of the gene encoding a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* strain A1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. . ISSN 0959-3993. 20:7 (2004) 711–717. doi: 10.1007/s11274-003-4514-5.
- JESTY, J.; BELTRAMI, E. - Positive feedbacks of coagulation: their role in threshold regulation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. . ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). 25:12 (2005) 2463–9. doi: 10.1161/01.ATV.0000187463.91403.b2.
- KASE, C. S. *et al.* - Intracranial hemorrhage after coronary thrombolysis with tissue plasminogen activator. **Am J Med**. . ISSN 0002-9343 (Print) 0002-9343 (Linking). 92:4 (1992) 384–90.
- KHAN, Mohammad Sazzad *et al.* - Serpin Inhibition Mechanism: A Delicate Balance between Native Metastable State and Polymerization. **Journal of Amino Acids**. 2011:2011) e606797. doi: 10.4061/2011/606797.
- KHO, C. W. *et al.* - Confirmation of Vpr as a fibrinolytic enzyme present in extracellular proteins of *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification**. . ISSN 1046-5928. 39:1 (2005) 1–7. doi: 10.1016/j.pep.2004.08.008.
- KIM, H. *et al.* - Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 84:4 (1997) 307–312.
- KIM, J. H.; KIM, Y. S. - A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. **Biosci Biotechnol Biochem**. . ISSN 0916-8451 (Print) 0916-8451 (Linking). 63:12 (1999) 2130–6.
- KIM, J. S. *et al.* - A fibrinolytic enzyme from the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **J Microbiol**. . ISSN 1225-8873 (Print) 1225-8873 (Linking). 44:6 (2006) 622–31.
- KIM, S. H.; CHOI, N. S. - Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. **Biosci Biotechnol Biochem**. . ISSN 0916-8451 (Print) 0916-8451 (Linking). 64:8 (2000) 1722–5.

- KIM, So-Young *et al.* - Purification and Properties of Bacteriolytic Enzymes from *Bacillus licheniformis* YS-1005 against *Streptococcus mutans*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. . ISSN 0916-8451. 63:1 (1999) 73–77. doi: 10.1271/bbb.63.73.
- KIM, W. *et al.* - Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. **Appl Environ Microbiol.** . ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). 62:7 (1996) 2482–8.
- KO, J. H. *et al.* - Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** . ISSN 1532-0456 (Print) 1532-0456 (Linking). 137:1 (2004) 65–74. doi: 10.1016/j.cca.2003.11.008.
- KOTB, Essam - Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity. Em **Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity** SpringerBriefs in Microbiology. [Em linha]. [S.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2012 [Consult. 23 out. 2014]. Disponível em WWW:<URL:http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-24980-8\_1>. ISBN 978-3-642-24979-2, 978-3-642-24980-8. p. 1–74.
- KOTB, Essam - Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes. **Appl Microbiol Biotechnol.** . ISSN 0175-7598. 97:15 (2013) 6647–6665. doi: 10.1007/s00253-013-5052-1.
- KUEHN, L. *et al.* - Proteinase inhibitors in rat serum. Purification and partial characterization of three functionally distinct trypsin inhibitors. **The Biochemical Journal.** . ISSN 0264-6021. 218:3 (1984) 953–959.
- LASKOWSKI, M.; KATO, I. - Protein Inhibitors of Proteinases. **Annual Review of Biochemistry.** 49:1 (1980) 593–626. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.003113.
- LEE, C. D.; MANN, K. G. - Activation/inactivation of human factor V by plasmin. **Blood.** . ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). 73:1 (1989) 185–90.
- LEE, JS.; BAI, HS.; PARK, SS. - Purification and characterization of two novel fibrinolytic proteases from mushroom, *Fomitella raxinea*. **J Microbiol Biotechnol.** 16:2006) 264–271.
- LEE, SK. *et al.* - Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. **J Microbiol Biotechnol.** 11:5 (2001) 845–852.
- LEONARDI, A.; GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I. - Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. **Toxicon.** . ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). 40:1 (2002) 55–62.
- LIBERATORE, G. T. *et al.* - Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. **Stroke.** . ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking). 34:2 (2003) 537–43.
- LUNDBLAD, Roger L. - **Biochemistry and Molecular Biology Compendium**. [S.l.] : CRC Press, 2007. ISBN 9781420043488.
- MARKLAND, F. S. - Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon.** . ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). 36:12 (1998) 1749–800.
- MATSUBARA, K. *et al.* - Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from a marine green alga, *Codium intricatum*. **Comparative Biochemistry and Physiology.** 119:1998) 177–181.
- MATSUBARA, K. *et al.* - A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. **Phytochemistry.** 52:6 (1999) 993–999.
- MATSUBARA, K. *et al.* - Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*.

**Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** . ISSN 1096-4959 (Print) 1096-4959 (Linking). 125:1 (2000) 137–43.

- MCDONAGH, Jan *et al.* - Molecular weight analysis of fibrinogen and fibrin chains by an improved sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis method. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure.** . ISSN 0005-2795. 257:1 (1972) 135–142. doi: 10.1016/0005-2795(72)90262-0.
- MCKEE, P. A.; MATTOCK, P.; HILL, R. L. - Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin, and cross-linked insoluble fibrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** . ISSN 0027-8424. 66:3 (1970) 738–744.
- MEHTA, R.; SHAPIRO, A. D. - Plasminogen deficiency. **Haemophilia.** . ISSN 1365-2516 (Electronic) 1351-8216 (Linking). 14:6 (2008) 1261–8. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01825.x.
- MIHARA, H. *et al.* - A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. **Jpn J Physiol.** . ISSN 0021-521X (Print) 0021-521X (Linking). 41:3 (1991) 461–72.
- MILOCHAU, A.; LASSEGUES, M.; VALEMBOIS, P. - Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. **Biochim Biophys Acta.** . ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). 1337:1 (1997) 123–32.
- MINE, Y.; WONG, A. H. K.; JIANG, B. - Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. **Food Research International.** . ISSN 0963-9969. 38:3 (2005) 243–250. doi: 10.1016/j.foodres.2004.04.008.
- NAKAJIMA, N. *et al.* - Chemical modification of earthworm fibrinolytic enzyme with human serum albumin fragment and characterization of the protease as a therapeutic enzyme. **Biosci Biotechnol Biochem.** . ISSN 0916-8451 (Print) 0916-8451 (Linking). 60:2 (1996) 293–300.
- NAKAJIMA, N.; MIHARA, H.; SUMI, H. - Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. **Biosci Biotechnol Biochem.** . ISSN 0916-8451 (Print) 0916-8451 (Linking). 57:10 (1993) 1726–30.
- NESHEIM, M. - Thrombin and fibrinolysis. **Chest.** . ISSN 0012-3692 (Print) 0012-3692 (Linking). 124:3 Suppl (2003) 33S–9S.
- NOH, KA. *et al.* - Isolation of fibrinolytic enzyme producing strains from kimchi. **Kor J Food Sci Technol.** 31:1999) 219–223.
- NONAKA, T. *et al.* - Amino acid sequences of metalloendopeptidases specific for acyl-lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. **J Biol Chem.** . ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). 272:48 (1997) 30032–9.
- ODÉN, Anders; FAHLÉN, Martin - Oral anticoagulation and risk of death: a medical record linkage study. **BMJ (Clinical research ed.).** . ISSN 1756-1833. 325:7372 (2002) 1073–1075.
- PENG, Y. *et al.* - Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** . ISSN 1096-4959 (Print) 1096-4959 (Linking). 134:1 (2003) 45–52.
- PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. - Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Appl Microbiol Biotechnol.** . ISSN 0175-7598 (Print) 0175-7598 (Linking). 69:2 (2005) 126–32. doi: 10.1007/s00253-005-0159-7.

- PINTO, A. F. *et al.* - Lonofibrase, a novel alpha-fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thromb Res.** . ISSN 0049-3848 (Print) 0049-3848 (Linking). 113:2 (2004) 147–54. doi: 10.1016/j.thromres.2004.01.012.
- POLGÁR, L. - The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and molecular life sciences: CMLS.** . ISSN 1420-682X. 62:19-20 (2005) 2161–2172. doi: 10.1007/s00018-005-5160-x.
- POTEMPA, J.; KORZUS, E.; TRAVIS, J. - The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. **The Journal of Biological Chemistry.** . ISSN 0021-9258. 269:23 (1994) 15957–15960.
- RAAPHORST, J. *et al.* - Early inhibition of activated fibrinolysis predicts microbial infection, shock and mortality in febrile medical patients. **Thromb Haemost.** . ISSN 0340-6245 (Print) 0340-6245 (Linking). 86:2 (2001) 543–9.
- RISS, Terry L. *et al.* - Cell Viability Assays. Em SITTAMPALAM, G. SITTA *et al.* (Eds.) - **Assay Guidance Manual** [Em linha]. Bethesda (MD) : Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004 [Consult. 17 set. 2014]. Disponível em WWW:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
- ROEMISCH, J. *et al.* - Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. **Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis.** . ISSN 0957-5235. 13:8 (2002) 657–670.
- RYAN, E. A. *et al.* - Influence of a natural and a synthetic inhibitor of factor XIIIa on fibrin clot rheology. **Biophysical Journal.** . ISSN 1542-0086. 77:5 (1999) 2827–2836.
- SAITO, H. - Alpha 2-plasmin inhibitor and its deficiency states. **J Lab Clin Med.** . ISSN 0022-2143 (Print) 0022-2143 (Linking). 112:6 (1988) 671–8.
- SALAZAR, Ana Maria *et al.* - A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. **Thrombosis Research.** . ISSN 0049-3848. 120:1 (2007) 95–104. doi: 10.1016/j.thromres.2006.07.004.
- SAMIS, J. A. *et al.* - Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. **Blood.** . ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). 95:3 (2000) 943–51.
- SANCHEZ MIRALLES, A. *et al.* - [Abnormalities in coagulation and fibrinolysis in septic shock with purpura]. **An Esp Pediatr.** . ISSN 0302-4342 (Print) 0302-4342 (Linking). 56:2 (2002) 99–103.
- SCHLEUNING, W. D. - Vampire bat plasminogen activator DSPA-alpha-1 (desmoteplase): a thrombolytic drug optimized by natural selection. **Haemostasis.** . ISSN 0301-0147 (Print) 0301-0147 (Linking). 31:3-6 (2001) 118–22.
- SCHUSTER, V.; SEREGARD, S. - Ligneous conjunctivitis. **Surv Ophthalmol.** . ISSN 0039-6257 (Print) 0039-6257 (Linking). 48:4 (2003) 369–88.
- SEO, J. H.; LEE, S. P. - Production of fibrinolytic enzyme from soybean grits fermented by *Bacillus firmus* NA-1. **J Med Food.** . ISSN 1096-620X (Print) 1096-620X (Linking). 7:4 (2004) 442–9. doi: 10.1089/jmf.2004.7.442.
- SIEBENLIST, K. R.; MOSESSON, M. W. - Progressive cross-linking of fibrin gamma chains increases resistance to fibrinolysis. **The Journal of Biological Chemistry.** . ISSN 0021-9258. 269:45 (1994) 28414–28419.
- SIEBENLIST, K. R.; MOSESSON, M. W. - Evidence of intramolecular cross-linked A alpha.gamma chain heterodimers in plasma fibrinogen. **Biochemistry.** . ISSN 0006-2960. 35:18 (1996) 5817–5821. doi: 10.1021/bi952264h.

- DE-SIMONE, S. G. *et al.* - Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two p-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** . ISSN 1570-0232 (Print) 1570-0232 (Linking). 822:1-2 (2005) 1–9. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.04.018.
- STANDEVEN, Kristina F. *et al.* - Functional analysis of fibrin  $\gamma$ -chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. **Blood.** . ISSN 0006-4971, 1528-0020. 110:3 (2007) 902–907. doi: 10.1182/blood-2007-01-066837.
- SUMI, H. *et al.* - A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. **Experientia.** . ISSN 0014-4754 (Print) 0014-4754 (Linking). 43:10 (1987) 1110–1.
- SUMI, H.; NAKAJIMA, N.; MIHARA, H. - Fibrinolysis relating substances in marine creatures. **Comp Biochem Physiol B.** . ISSN 0305-0491 (Print) 0305-0491 (Linking). 102:1 (1992) 163–7.
- SUN, T. *et al.* - New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*. **Process Biochemistry.** 33:4 (1998) 419–422.
- SUZUKI, Y. *et al.* - Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. **Life Sci.** . ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). 73:10 (2003) 1289–98.
- SWENSON, S.; MARKLAND, F. S., Jr. - Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon.** . ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). 45:8 (2005) 1021–39. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.027.
- TANG, Y. *et al.* - Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component a: revealing the structural determinants of its dual fibrinolytic activity. **J Mol Biol.** . ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). 321:1 (2002) 57–68.
- TASSY, Caroline *et al.* - Muscle endopin 1, a muscle intracellular serpin which strongly inhibits elastase: purification, characterization, cellular localization and tissue distribution. **The Biochemical Journal.** . ISSN 1470-8728. 388:Pt 1 (2005) 273–280. doi: 10.1042/BJ20041921.
- TOUBARRO, D. *et al.* - Serine protease-mediated host invasion by the parasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. **J Biol Chem.** . ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). 285:40 (2010) 30666–75. doi: 10.1074/jbc.M110.129346.
- TURPIE, A. G.; CHIN, B. S.; LIP, G. Y. - ABC of antithrombotic therapy: Venous thromboembolism: treatment strategies. **BMJ.** . ISSN 1756-1833 (Electronic) 0959-535X (Linking). 325:7370 (2002) 948–50.
- VELJKOVIC, D. K. *et al.* - Increased expression of urokinase plasminogen activator in Quebec platelet disorder is linked to megakaryocyte differentiation. **Blood.** . ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). 113:7 (2009) 1535–42. doi: 10.1182/blood-2008-08-172338.
- WANG, F. *et al.* - Purification, characterization and crystallization of a group of earthworm fibrinolytic enzymes from *Eisenia fetida*. **Biotechnol Lett.** . ISSN 0141-5492 (Print) 0141-5492 (Linking). 25:13 (2003) 1105–9.
- WANG, J.; WANG, M.; WANG, Y. - Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* spp. **Chin J Biotechnol.** . ISSN 1042-749X (Print) 1042-749X (Linking). 15:2 (1999) 83–9.

- WANG, MingQi *et al.* - Modeling of the fibrin agarose plate assay and its application for thrombolytic analysis. **Chinese Science Bulletin**. . ISSN 1001-6538, 1861-9541. 57:24 (2012) 3233–3238. doi: 10.1007/s11434-012-5297-6.
- WANG, S. *et al.* - A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. **Process Biochemistry**. 44:2009) 70–76.
- WANG, S. *et al.* - A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. . ISSN 1879-1107 (Electronic) 1096-4959 (Linking). 159:1 (2011) 18–25. doi: 10.1016/j.cbpb.2011.01.004.
- WESTENDORP, R. G.; HOTTENGA, J. J.; SLAGBOOM, P. E. - Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock. **Lancet**. . ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). 354:9178 (1999) 561–3. doi: 10.1016/S0140-6736(98)09376-3.
- WHITE, J. - Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**. . ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). 45:8 (2005) 951–67. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.030.
- WILLIAMS, E. C. - Plasma alpha 2-antiplasmin activity. Role in the evaluation and management of fibrinolytic states and other bleeding disorders. **Arch Intern Med**. . ISSN 0003-9926 (Print) 0003-9926 (Linking). 149:8 (1989) 1769–72.
- WU, B. *et al.* - Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CICC 480097. **J Ind Microbiol Biotechnol**. . ISSN 1476-5535 (Electronic) 1367-5435 (Linking). 36:3 (2009) 451–9. doi: 10.1007/s10295-008-0516-5.
- WU, Xi-Yang *et al.* - Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**. . ISSN 0167-7012. 64:1 (2006) 107–119. doi: 10.1016/j.mimet.2005.04.021.
- XIAO-LAN, L. *et al.* - Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12. **Appl Microbiol Biotechnol**. . ISSN 0175-7598 (Print) 0175-7598 (Linking). 67:2 (2005) 209–14. doi: 10.1007/s00253-004-1846-5.
- XIAO, Lu; ZHANG, Ren-Huai; ZHANG, Yi-Zheng - Isolation of a *Micrococcus luteus* Strain with Producing Fibrinolysin and Cloning of Fibrinolytic Enzyme gene. **Institute of Microbiology, CAS**. 35:9 (2008) 1443–1449.
- XU, YH. *et al.* - Cloning and expression of the novel gene-pV242 of earthworm fibrinolytic enzyme. **Prog Biochem Biophys**. 29:2002) 610–614.
- YANG, J. S.; RU, B. G. - Purification and characterization of an SDS-activated fibrinolytic enzyme from *Eisenia fetida*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. . ISSN 1096-4959 (Print) 1096-4959 (Linking). 118:3 (1997) 623–31.
- YOON, Seon-Joo. *et al.* - Screening and Characterization of Microorganisms with Fibrinolytic Activity from Fermented Foods. **Journal of microbiology and biotechnology**. . ISSN 1017-7825 @ 1738-8872 @. VOL.12:2002) 649–656.
- YOU, W. K. *et al.* - Purification and molecular cloning of a novel serine protease from the centipede, *Scolopendra subspinipes mutilans*. **Insect Biochem Mol Biol**. . ISSN 0965-1748 (Print) 0965-1748 (Linking). 34:3 (2004) 239–50. doi: 10.1016/j.ibmb.2003.10.003.
- YUAN, Jun *et al.* - Thrombolytic effects of Douchi Fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* LD-8547 in vitro and in vivo. **BMC Biotechnology**. . ISSN 1472-6750. 12:1 (2012) 36. doi: 10.1186/1472-6750-12-36.