

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Ação Fibrinolítica de Proteases Produzidas por Bactérias Isoladas de Ambientes Amazônicos

Thayana Cruz de Souza¹, Anni Kelle Serrão de Lima¹, Michele Silva de Jesus¹, Raimundo Felipe da Cruz Filho², Ormezinda Celeste Cristo Fernandes¹

¹Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/Fiocruz/Amazonas, Rua Teresina, 476 - Adrianópolis, Manaus - AM, 69057-070. E-mail thayanacruz@gmail.com

²Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Avenida General Rodrigo Octávio, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, 69077-000.

RESUMO

*A trombose é considerada uma das principais causas de doenças cardiovasculares na vida moderna, pois pode levar a infarto cerebral e do miocárdio, devido à coágulos de sangue não lisados. Devido a isso, as proteases que podem interferir na coagulação do sangue têm sido investigadas a partir de várias fontes microbianas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi isolar bactérias produtoras de proteases com ação fibrinolítica. A atividade proteolítica foi investigada em Agar leite. Em seguida, foi feita a fermentação submersa para obtenção do extrato bruto, a partir disso, realizou-se a quantificação da atividade proteolítica e avaliação quanto ao potencial fibrinolítico dos extratos em placa de fibrina. Das 150 amostras analisadas, 58% das culturas foram positiva para protease e 18% apresentaram ação fibrinolítica, destacando as espécies do gênero *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 529 e CBAM 526 com 345 U/mL e 279 U/mL de atividade proteolítica, respectivamente. Esses resultados sugerem que as bactérias isoladas de ambientes amazônicos são micro-organismos promissores para produção de proteases fibrinolíticas que podem ser alternativas para aplicação farmacêutica.*

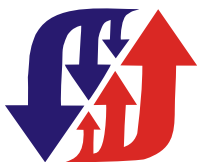
Palavras-chave: proteases, fermentação, fibrina, *Pseudomonas*

INTRODUÇÃO

A trombose é considerada uma das principais causas de doenças cardiovasculares na vida moderna (Silva et al. 2013; Ashis & Sudhir, 2011), pois pode levar a infarto cerebral e do miocárdio, devido à coágulos de sangue não lisados (Abidi et al. 2014).

Um certo número de proteases que pode interferir na coagulação do sangue tem sido purificada e caracterizada a partir de várias fontes, incluindo micro-organismos. Algumas destas proteases são enzimas fibrinolíticas capazes de digerir a fibrina (Sumi et al. 1995). Atualmente os agentes fibrinolíticos disponíveis para uso clínico são principalmente ativadores de plasminogênio, tais como o ativador de plasminogênio tissular, uroquinase e a estreptoquinase. Apesar da sua utilização generalizada, estes agentes apresentam baixa especificidade para fibrina, são muito caros e causam efeitos indesejados.

Consequentemente, a busca por enzimas fibrinolíticas para utilização na terapia contra trombose é um exercício contínuo, sendo que as proteases de origem microbiana são



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

preferidas em comparação as que são obtidas a partir de fontes vegetais e animais, uma vez que aquelas possuem quase todas as características desejadas para as suas aplicações biotecnológicas, tais como baixo tempo de produção, facilidade de cultivo e de manipulação genética (Abidi et al. 2014).

Neste sentido, esse estudo teve como objetivo isolar, identificar e incorporar na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM) culturas de bactérias produtoras de proteases, e investiga-las quanto à ação fibrinolítica.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e Investigação da Produção de Proteases

Para este estudo foram utilizadas 150 culturas de bactérias isoladas de solo e água. As amostras produtoras de proteases foram identificadas com o Kit de identificação BBL Cristal e incorporadas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM/FIOCRUZ-Brasil).

Para obtenção do inóculo, as culturas foram subcultivadas em Agar Nutriente em placas de Petri ($\varnothing=90\text{mm}\times 15\text{mm}$). Os cultivos foram mantidos a 37 °C por 24 horas (cultura estoque). A partir desta cultura, foi feito um inóculo central de cada amostra em Ágar Leite (Teixeira et al. 2011), para a investigação da produção de proteases. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A formação de halos translúcidos ao redor da colônia indicou atividade positiva para enzima.

Preparo do inóculo e obtenção do extrato enzimático

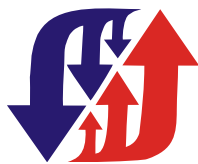
A fermentação submersa foi realizada transferindo-se 1 mL da suspensão celular similar a escala de MC Farland 0,5 em frascos de Erlenmeyers (50 mL) contendo 30 mL da solução de Manachini (1987) suplementado com gelatina a 0,5%. A fermentação submersa foi conduzida em agitador orbital durante 24 h/150 rpm/37 °C. O extrato foi separado da biomassa por filtração a vácuo. No extrato bruto recuperado foi determinada a atividade proteolítica.

Quantificação da atividade proteolítica

A quantificação da atividade proteolítica foi feita de acordo com Fleuri & Sato (2008) utilizando caseína como substrato (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em tampão fostato 0,15M. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um alteração de 0,01 na absorbância a 280 nm por minuto.

Avaliação da atividade fibrinolítica

Os extratos brutos com ação proteolítica foram submetidos ao método de placa de fibrina de acordo com o método descrito por Astrup e Mullertz (1952), com pequenas modificações. A placa de fibrina (9 cm de diâmetro contendo 3 mm de espessura de gel de fibrina) foi preparada vertendo-se a mistura de 10 mL de fibrinogênio [0,5% (p/v)] e gel de agarose [1% (p/v)] com 0,1 mL de uma suspensão de trombina (100 unidades NIH/mL). Em seguida, foram confeccionados furos de 0,5 mm de diâmetro para aplicação de 20 μL do extrato enzimático fibrinolítico bruto, e posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas e o diâmetro do halo translúcido foi medido .



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisadas 150 culturas de bactérias isoladas de solo e água da região amazônica, das quais 58% foram produtoras de protease. Pode-se destacar as culturas de *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 529 e CBAM 526 com 345 U/mL e 279 U/mL de atividade proteolítica, respectivamente.

Quanto à atividade fibrinolítica, 18% das culturas apresentaram positividade no teste em placa de fibrina com variação de 7 a 27 mm no diâmetro dos halos. Pode-se destacar as amostras CBAM 516 *P. aeruginosa* (27 mm), CBAM 529 *P. aeruginosa* (27 mm), CBAM 368 *Burkholderia cepacia* (26 mm), CBAM 519 *Serratia marcescens* (25 mm) e CBAM 546 *Bacillus cereus* (25 mm).

Todas as culturas que apresentaram ação proteolítica foram identificadas e incorporadas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM). Sendo mais prevalente os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* com 45% e 32% de amostras isoladas e produtoras de enzima, respectivamente.

De acordo com Raju & Divakar (2014) o gênero *Bacillus* é um dos mais importantes entre os microrganismos que têm sido encontrados para produzir as enzimas fibrinolíticas. Ao longo do tempo, foram sendo descobertas enzimas fibrinolíticas de origem bacteriana, tais como a Nattokinase (NK) a partir de *B. natto* (Sumi et al. 1987) e Subtilisina DFE e subtilisin DJ- 4 a partir de *B. amyloliquefaciens* (Pegui et al. 2002). Outro estudo indica que a nattokinase também pode ser purificada a partir do sobrenadante da cultura de estirpe TKU015 de *Pseudomonas* sp. isolada a partir do solo e que apresenta elevada atividade sobre a fibrina (Wang et al., 2009).

Esses resultados sugerem que as bactérias isoladas na Amazônia e depositadas na CBAM são micro-organismos promissores para produção de enzimas fibrinolíticas que podem ser alternativas para aplicação farmacêutica no tratamento contra trombose.

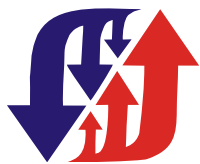
CONCLUSÕES

Esse trabalho confirma o enorme potencial biotecnológico da biodiversidade brasileira, enfatizando as culturas bacterianas isoladas em ambientes amazônicos. Vale ressaltar que essas culturas capazes de produzir proteases com ação fibrinolítica e que podem ser usadas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos estão mantidas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM), portanto, as informações contidas nesta coleção são recursos-chave para que o país possa utilizá-las no estabelecimento de estratégias rápidas e eficientes para o desenvolvimento científico e tecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTRUP T, MULLERTZ S. 1952. The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity. Arch Biochem Biophys;40:346–51. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90121-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(52)90121-5).

SILVA GMM, MARQUES DAV, PORTO TS, FILHO JLL, TEIXEIRA JAC, JÚNIOR AP, PORTO ALF. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. Fluid Phase Equilibria 339 p. 52– 57.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

FLEURI LF, SATO HH 2008. Study of different parameters in the production of Lytic enzymes. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 28 299-310 pp.

MANACHINI PL, FORTINA MG, PARINI C 1987. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters* 9: 219-224.

Holden RW 1990 Plasminogen activators: Pharmacology and therapy. *Radiology* 174 993–1001

RAJU EVN, DIVAKAR G. 2014. An overview on microbial fibrinolytic proteases. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 5(3): 643-656.

TEIXEIRA, M.F.S., SILVA, T.A., PALHETA, R. A., CARNEIRO, A.L.B., ATAYDE, H.M. 2011. Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas). Manaus. Edua.

SUMI H, NAKAJIMA N, YATAGAI C 1995 A unique strong fibrinolytic enzyme (datsuwo kinase) in skipjack “Shiokara”, a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B 543–547

SUMI H, HAMADA H, TSUSHIMA H, MIHARA H AND MURAKI H: 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*; 43(10): 1110- 1111.

PENG Y AND ZHANG YZ. 2002. Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme producing strain DC-4 from Chinese douche and primary analysis of the enzyme property. *Chin High Technol Lett* 2002; 12: 30-34.

WANG, S. et al. - A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. *Process Biochemistry*. 44:2009) 70–76.