

Guilherme Henrique Marchi Salvador

**“ESTUDOS SOBRE A INFLUÊNCIA DE PROTEÍNAS
OFÍDICAS NOS DIFERENTES FATORES DE
COAGULAÇÃO”**

Relatório de Pós-doutorado

Universidade Estadual Paulista

Instituto de Biociências de Botucatu – Departamento de Biofísica e Farmacologia

Supervisor: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Editais: 05/2024/PROPe - Programa Unesp de Pós-Doutorado

Botucatu – SP

2025

1. Apresentação do relatório científico

O relatório científico a seguir se refere ao período de vigência da proposta, a qual apresentou cinco principais objetivos, sendo eles:

I) Testes de coagulação sanguínea envolvendo *pool* de plasma enriquecido com fatores de coagulação e toxinas ofídicas;

II) Experimentos da interação entre as proteínas isoladas e fatores de coagulação por meio de métodos biofísicos, como a Calorimetria por Titulação Isotérmica (ITC), Termoforese em microescala (MST) e Espectroscopia de Fluorescência;

III) Estudos bioquímicos e farmacológicos com toxinas e os fatores de coagulação;

IV) Experimentos de co-cristalização e resolução da estrutura cristalográfica dos complexos entre as proteínas ofídicas e fatores de coagulação;

V) Estudos de bioinformática utilizando *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular envolvendo as estruturas cristalográficas de diferentes proteínas ofídicas depositadas no banco de dados *RCSB Protein Data Bank* em conjunto com os fatores de coagulação.

2. Atividades realizadas

Foram realizados diferentes experimentos envolvendo as toxinas MjTX-I e MjTX-II (isoladas da peçonha de *Bothrops moojeni*), complexo crotoxina (Crotoxina A e B) e Crotoxina B (isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*) e os fatores de coagulação VIII e IX, buscando entender quais são suas relações no processo de coagulação sanguínea.

No período, experimentos de cromatografia líquida foram executados para a obtenção das toxinas MjTX-I e MjTX-II com alto grau de pureza, utilizando duas etapas de purificação à partir da peçonha bruta, sendo a primeira etapa um fracionamento usando a técnica de troca iônica com coluna do tipo *CM sepharose FF 5mL (Cytiva)* e, como segunda etapa, purificação das frações obtidas aplicando em uma coluna de fase reversa do tipo *Shim-pack C-18 1mL (Shimadzu)* (Salvador et al., 2019). O complexo crotoxina (Crotoxina A e B) e Crotoxina B foram cedidas pelo colaborador Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, pesquisador da Fiocruz de Rondônia.

Experimentos de coagulação sanguínea foram realizados utilizando: toxinas MjTX-I, MjTX-II, complexo Crotoxina (CTX) e Crotoxina B (CB); fator de coagulação VIII; fator de coagulação IX. Além disso, o plasma foi suplementado com os fatores VIII e IX em 25%, 50%, 100%, 150% e 200%, posteriormente misturados com a toxina (Figura 1).

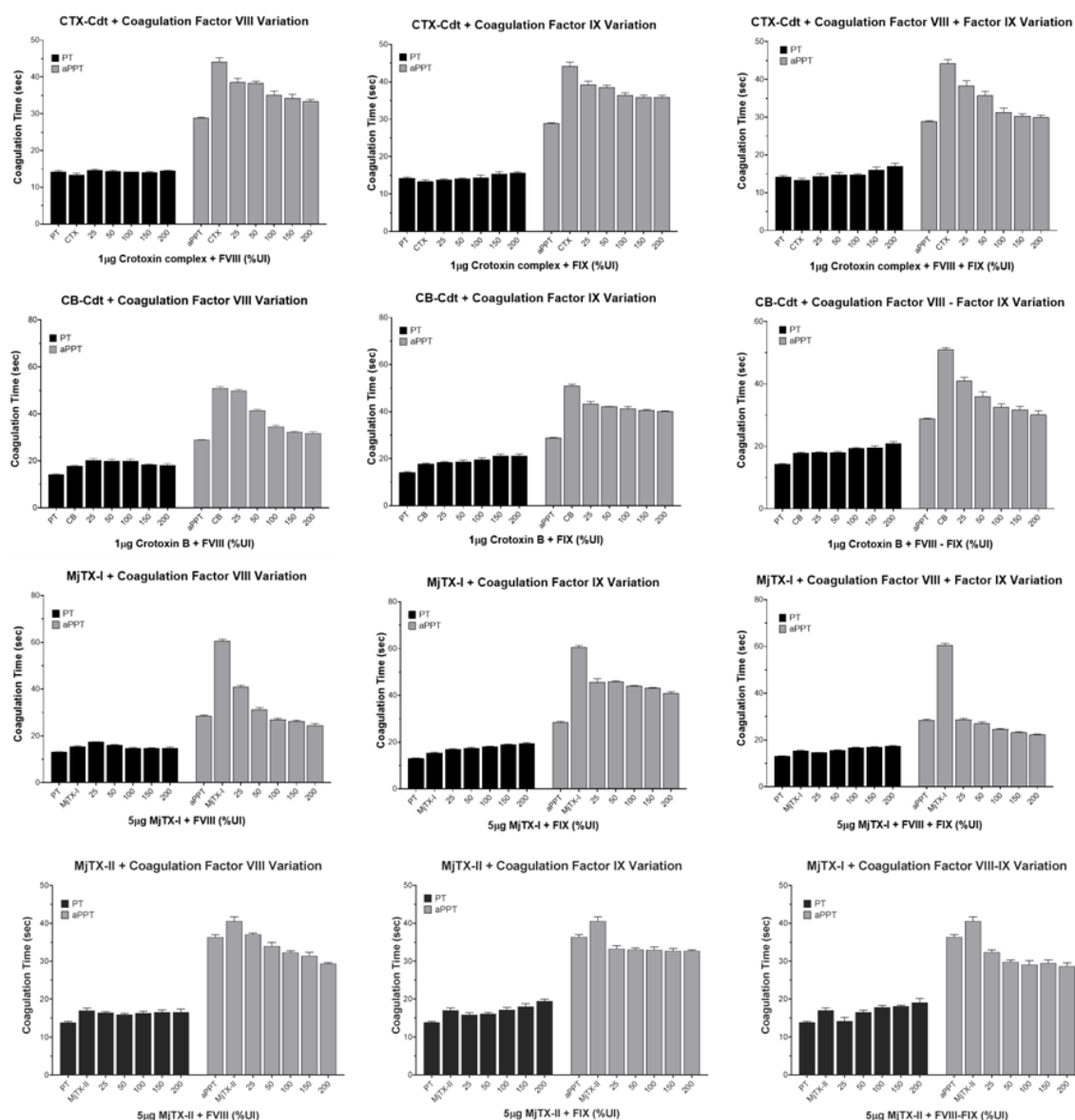


Figura 1: Gráficos com valores de Tempo de Protrombina (TP) (barras pretas) e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) (barras cinzas), obtidos à partir da mistura entre as toxinas complexo Crotoxina, Crotoxina B, MjTX-I e MjTX-II e os fatores de coagulação em diferentes concentrações.

Esses resultados mostram que as toxinas MjTX-I, MjTX-II e Crotoxina B causam perceptível influência no processo de coagulação sanguínea, aumentando os valores de TP e TTPa. Também, é possível observar que após a suplementação do plasma sanguíneo com os fatores VIII e IX, os valores de TP e TTPa tendem se aproximar dos valores de referência. Para os experimentos envolvendo o complexo Crotoxina, não houve alteração significativa nos valores de TP, ao contrário do observado nos valores, de TTPa que, após a suplementação do plasma com os fatores de coagulação, tendem a se normalizar.

Além disso, experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizados utilizando as amostras de toxina MjTX-II; fator de coagulação VIII; fator de

coagulação IX; MjTX-II + Fator VIII e; MjTX-II + Fator IX, fazendo o uso do equipamento DynaPro Titan (Wyatt Technology). A tabela 1 apresenta os resultados obtidos com as proteínas na concentração de 3 mg/mL^{-1} , na temperatura de 10°C , mensuradas 100 vezes. Os resultados foram analisados utilizando o *software* Dynamics v.6.10 (Wyatt Technology).

Tabela 1: Dados obtidos nos experimentos de DLS.

Proteína/Complexo	Rh (nm)	% Polidispersão	Massa molecular estimada (kDa)
MjTX-II	2,3	12	23
Fator VIII	4,8	11,6	129
Fator IX	3,2	22,1	52
MjTX-II + Fator VIII	5,2	3,9	159
MjTX-II + Fator IX	4,8	19,7	134

Os resultados obtidos mostram que, após a adição da toxina MjTX-II aos fatores VIII e IX, há um incremento no valor do raio hidrodinâmico, indicando a formação de complexos entre a toxina e fatores de coagulação.

Experimentos de co-cristalização envolvendo a toxina MjTX-II e os fatores de coagulação VII e IX foram realizados. Foram obtidos monocristais dos possíveis complexos MjTX-II/fator VIII (Figura 2A) e MjTX-II/fator IX (Figura 2B), que até o momento não foram submetidos a experimentos de difração de raios X.

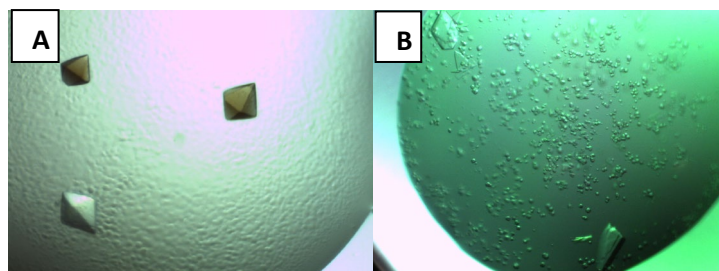


Figura 2. **A.** Monocristais do complexo MjTX-II/Fator de coagulação VIII. **B.** Monocristais e policristais do complexo MjTX-II/Fator IX.

Ensaio de bioinformática também foram realizados visando obter informações estruturais na formação dos complexos. Utilizando o servidor online *GRAMM* (*Global Range Molecular Matching*) com a metodologia de *Docking* livre, foram obtidos 20 modelos de interação entre a toxina para cada fator de coagulação. Os resultados de ancoragem molecular mostraram pode ocorrer a interação da toxina MjTX-II e os fatores VIII (**Figura 3A**) e IX (**Figura 4A**) em regiões de alta relevância nestes fatores, como os sítios de interação descritos como essenciais na formação do complexo Fator VIII + IX (Ngo et al., 2008), exibindo uma energia de ligação de $-34,60 \text{ kcal/mol}^{-1}$ e $-36,46 \text{ kcal/mol}^{-1}$, respectivamente.

Os complexos MjTX-II/Fator VIII e MjTX-II/Fator IX obtidos por meio da ancoragem molecular, foram submetidos à simulações de dinâmica molecular realizados utilizando o software *GROMACS* (*Groningen Machine for Chemical Simulations*), que demonstrou alta estabilidade do complexo formado após 300 ns de simulação, onde os contatos entre a toxina/fatores VIII (**Figura 3B**) e IX (**Figura 4B**) em seus sítios de ligação foram mantidos.

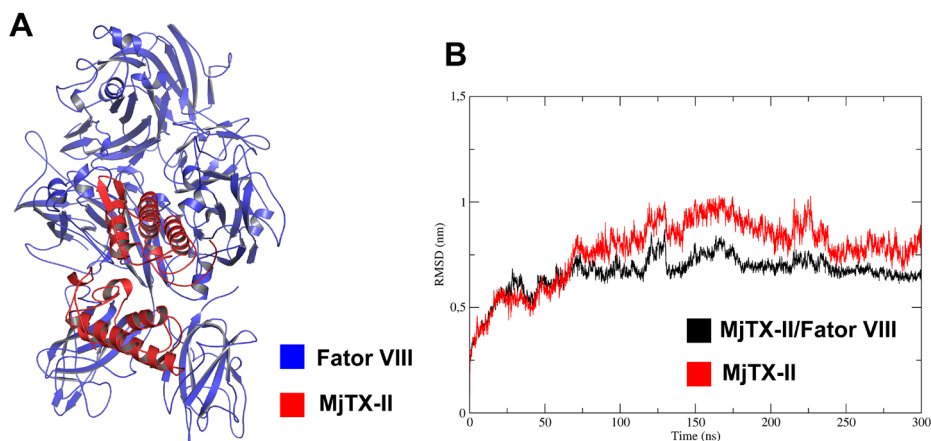


Figura 3. **A.** Complexo obtido entre MjTX-II (Vermelho) e Fator de coagulação VIII (Azul). **B.** Gráfico de RMSD obtido após 300 ns de simulação de dinâmica molecular do complexo MjTX-II/Fator VIII (linha preta) e da MjTX-II sozinha (linha vermelha).

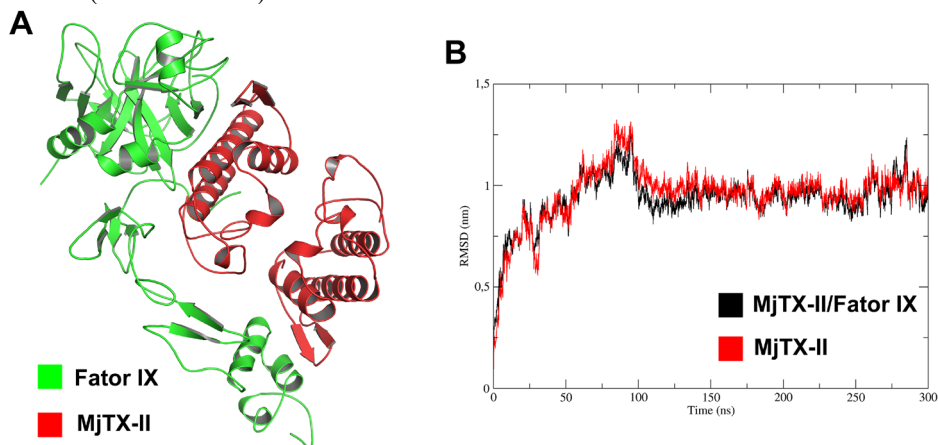


Figura 4. **A.** Complexo obtido entre MjTX-II (Vermelho) e Fator de coagulação IX (verde). **B.** Gráfico de RMSD obtido após 300 ns de simulação de dinâmica molecular do complexo MjTX-II/Fator IX (linha preta) e da MjTX-II sozinha (linha vermelha).

3. Produção bibliográfica e atividades do bolsista

Também no período, o bolsista participou da publicação de três artigos científicos em revistas indexadas, sendo:

- Macedo, J. M.; Souza, M. F.; Lima, A. M.; Francisco, A. F.; Kayano, A. M.; Gusmao, M. E. M. L.; de Araujo, E. C. S.; **Salvador, G. H. M.**; Fontes, M. R. M.; Zuliani, J. P.; Soares, A. M. Molecular interaction assays *in silico* of crotapotin from *Crotalus durissus terrificus* against the molecular target

trypanothione reductase from *Leishmania braziliensis*. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, 31:e20240049, **2025**. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2024-0049.

- Paiva, S. C.; **Salvador, G. H. M.**; Barbosa, P. S.; Oliveira, H. C.; Fernandes, C. A. H., Ramos, C. H. I.; Fontes, M. R. M.; Cano, M. I. N. Exploring the structure and nucleic acid interactions of the *Leishmania* sp. telomerase reverse transcriptase N-terminal region. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 764, 110289, **2025**. DOI: 10.1016/j.abb.2025.110289.
- **Salvador, G. H. M.**; Cardoso, F. F.; Lomonte, B.; Fontes, M. R. M. Inhibitors and activators for myotoxin phospholipases A₂-like toxins from snake venoms - A structural overview. **Biochimie**, 227, 231-247, **2024**. DOI: 10.1016/j.biochi.2024.07.016.

Nos dois primeiros artigos apresentados, o bolsista participou em suas elaborações por meio de colaborações entre o grupo de pesquisa em que o bolsista está inserido e outros laboratórios, sendo temas não relacionados diretamente com esta proposta. Entretanto, vale ressaltar que este último artigo, em que o bolsista é o autor principal, serve como base científica para as discussões dos resultados obtidos diretamente neste projeto.

Também nesse período, foi apresentado um trabalho científico no XXXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP por uma aluna de graduação em que o bolsista coorientava. Neste mesmo congresso, o bolsista foi convidado a participar como avaliador de trabalhos da primeira fase. Também, um trabalho científico foi apresentado por um colaborador na 54ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), que será realizada no mês de maio de 2025.

No período, o bolsista foi coorientador de mestrado acadêmico do aluno Ivan Rossi de Moraes pelo programa de Pós Graduação em Ciências biológicas (A/C Genética), finalizado no segundo semestre do ano de 2024. Além disso, participou como membro avaliador do exame de qualificação de Yasmin El Hayek Martins, discente do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

4. Referências bibliográficas

Salvador, G. H. M.; Cardoso, F. F.; Gomes, A. A. S.; Cavalcante, W. L. G.; Gallacci, M.; Fontes, M. R. M. Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A₂-like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches. **Scientific Reports**, 2019, 9:510. DOI:10.1038/s41598-018-36839-6.

Ngo, J. C. K.; Mingdong, H., Roth, D. A.; Furie, B. C.; Furie, B. Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications of the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex. **Structure**, 2008, 16:597-606. DOI: 10.1016/j.str.2008.03.001.