

Caracterização físico-química e estrutural do SbKI, um
inibidor de serinoproteases de sementes de barbatimão
(*Stryphnodendron barbatiman*)

Marcel Nakahira

USP/IFSC/SBI



8-2-001659

Dissertação apresentada ao
Instituto de Física de São
Carlos, da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências: Física
Aplicada-Opção:Física
Biomolecular.

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini

São Carlos – 2004

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Nakahira, Marcel

“Caracterização físico-química e estrutural do SbKI, um inibidor de serinoproteases de sementes de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*).”
Marcel Nakahira – São Carlos, 2004

Dissertação (Mestrado) – Área de Física Aplicada opção: Física Biomolecular
do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo
2004 - Páginas: 67

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Beltrami

Inibidor de protease, inibidor de serinoproteases, inibidores proteicos .

I. Título



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE MARCEL NAKAHIRA APRESENTADA AO INSTITUTO DE
FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 17/12/2004.

COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Leila Maria Beltramini (Orientador e Presidente) – IFSC/USP

Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva – UNIFESP

Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior – IFSC/USP

*As pessoas que direta ou indiretamente
passam utilizar as informações contidas neste
trabalho de modo a sobrepunjar o desconhecido
bem como aquelas que buscam o que se é
desconhecido...*

ofereço

*Dedico este trabalho às pessoas que sempre estiveram do
meu lado: à minha família (sem me esquecer das
minhas recentes sobrinhas que me fixeram literalmente
ser tio) pelo amor, carinho e confiança que sempre
tiveram, à professora Leila, por ter me recebido e dado
todas as condições para que realizasse este trabalho, à
Bel que me recebeu de braços abertos e pelos
ensinamentos e às pessoas do grupo, pela Amizade
incondicional...*

dedico

Agradecimentos

Durante o período que este trabalho foi desenvolvido tive, sem dúvida alguma, o apoio de pessoas especiais. A essas pessoas manifesto minha eterna gratidão:

À minha família: minha mãe, meu pai, minhas irmãs, minhas sobrinhas, meus tios e tias, meus avôs e avós e meus primos e primas, pelo apoio e amor que sempre depositaram em mim;

À professora Leila Maria Beltramini pela orientação, apoio e confiança contribuindo para minha formação;

À Bel que me recebeu com carinho e atenção; pelos ensinamentos e dedicação que sempre teve; pelas conversas na sala 7;

À professora Maria Luiza pela realização dos testes de inibição contribuindo para a realização trabalho;

À professora Heloisa Sobreiro pela atenção e simpatia com que sempre me recebeu em seu laboratório; pelas análises do N-terminal, importante contribuição neste trabalho;

Ao professor Antônio Miranda pela determinação da massa molecular;

Aos professores da biofísica: Otaciro, Ana Paula, Antônio, Nelma e Cristina Nonato, pelos ensinamento, convivência e incentivo durante esses anos;

Aos amigos da Biofísica: Alessandra, Ana Paula, Anderson, André, Andressa, Assuero, Carolina, Cíntia, Cristina Nordi, Daniel, Daniela, Daniella, Emanni, Elisângela, Ester, Fernanda, Fernando, Gustavo, José Luis, Júlio César, Júlio Carvalho, Kelven, Leandro, Luciano, Luis Guilherme, Maikel, Marli, Marlon, Meire, Melissa, Patrícia, Priscila, Roberto, Roseane, Rosemeire, Sheila Couto, Sheila, Susana, Tais, Tales, Vera e Wânius pela conversas, risadas,.....pela Amizade.

Às pessoas do grupo de cristalografia: Alexandre, Cláudia Munte, Cláudia Alves, Cláudia, Dulce, Fábio, Fernando, Jaciara, Liliana, Otávio, Raquel, Richard, Rodrigo pela convivência e amizade.

Aos amigos: Daiane, Débora, João, Juliana, Marcelo, Marisa, Rafael, Ricardo, Roselene, Sirlei, Wendell, Weslei, Márcia, Marcelo e Ricardo.

À Wladerez, Cristiane e funcionários da biblioteca que sempre com sorriso, simpatia e atenção recebem todos nós;

Às pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, bem como em minha formação profissional;

A CAPES, FAPESP E CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Física de São Carlos, especialmente ao grupo de Biofísica, onde realizei este trabalho.

Índice

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas.....	iii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	iv
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Proteases.....	2
1.1.1. Classificação das proteases.....	3
1.1.2. Serinoproteases.....	4
1.1.2.1. Coagulação sanguínea.....	5
1.2. Inibidores de proteases.....	8
1.2.1. Inibidores de serinoproteases.....	11
Capítulo 2 - Objetivos	16
Capítulo 3 - Materiais e métodos	18
3.1. Extração dos inibidores.....	19
3.2. Determinação da concentração de proteína.....	19
3.3. Procedimentos cromatográficos.....	22
3.3.1. Cromatografia de exclusão molecular.....	22
3.3.2. Cromatografia de troca iônica.....	23
3.3.3. Cromatografia de fase reversa.....	24
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida - tricina	25
3.5. Determinação da focalização isoeletrico (IEF).....	26
3.6. Redução e alquilação dos resíduos de cisteína e separação das cadeias.....	27
3.7. Análise do N-terminal.....	28
3.8. Determinação da massa molecular da proteína por espectrometria de massa.....	28
3.9. Testes de atividades biológicas.....	29
3.9.1. Atividade inibitória da coagulação.....	29
3.9.2. Atividade inibitória da atividade enzimática de tripsina.....	30
3.10. Estudos estruturais.....	30
3.10.1. Análise de Dicroísmo Circular.....	30
3.10.2. Análise da estabilidade do inibidor em diferentes pHs por CD.....	33
3.10.3. Análise da estabilidade do inibidor em diferentes temperaturas por CD.....	33
3.10.4. Análise de fluorescência estática.....	34
3.11. Ensaios de inibição para determinação do K_I	35

3.11.1. Determinação do K_I para a tripsina.....	35
3.11.2. Determinação do K_I para a calicreína plasmática humana.....	35

Capítulo 4 - Resultados e Discussões

4.1. Atividade anticoagulante.....	38
4.2. Cromatografia de exclusão molecular.....	38
4.3. Cromatografia de troca iônica.....	41
4.4. Cromatografia de fase reversa.....	42
4.5. Separação das cadeias após redução e alquilação.....	44
4.6. Espectrometria de massa	46
4.7. Determinação e análise da seqüência N-terminal.....	47
4.8. Determinação do ponto isoelétrico (pI).....	49
4.9. Ensaio de inibição da atividade enzimática da tripsina e calicreína	50
4.9.1. Determinação da atividade inibitória da tripsina pelo SbKI.....	50
4.9.2. Determinação da atividade inibitória da calicreína pelo SbKI.....	51
4.10. Estudos estruturais do SbKI.....	53
4.10.1. Análise da estabilidade do inibidor em diferentes pHs.....	55
4.10.2. Análise da estabilidade do inibidor em diferentes temperaturas por CD.....	57
4.11. Conclusões finais.....	59
Referências	60

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da serinoprotease tripsina.....	5
Figura 2. Esquema da coagulação sanguínea.....	7
Figura 3. Fluxograma da metodologia empregada para a purificação e caracterização do inibidor.....	21
Figura 4. Origem do efeito de dicroísmo circular.....	32
Figura 5. Perfil cromatográfico na coluna de exclusão molecular – coluna Superdex-75.....	38
Figura 6. SDS-PAGE mostrando os resultados dos passos de purificação do inibidor.....	39
Figura 7. Perfil cromatográfico na coluna de troca iônica - coluna Mono S.....	41
Figura 8. Perfil cromatográfico na coluna de fase reversa - coluna C-18.....	42
Figura 9. Perfil cromatográfico na coluna de fase reversa (coluna C-18) da proteína após redução e alquilação.....	44
Figura 10. SDS-PAGE mostrando o resultado da reação de redução e alquilação.....	45
Figura 11. Determinação do ponto isoelétrico do inibidor.....	49
Figura 12. Gráfico mostrando a inibição de tripsina por SbKI.....	50
Figura 13. Gráfico mostrando a inibição de calicreína plasmática humana (HuPK) por SbKI.....	51
Figura 14. Espectro de CD do inibidor SbKI.....	53
Figura 15. Espectros de emissão de fluorescência do inibidor SbKI.....	54
Figura 16. Espectros de CD do inibidor em diferentes pHs.....	55
Figura 17. Espectros de emissão de fluorescência do inibidor em diferentes pHs.....	56

Figura 18. Espectros de CD do SbKI variando-se a temperatura.....57

Lista de tabelas

Tabela 1. As famílias de proteínas inibidoras de serinoproteinases.....	12
Tabela 2. Comparação dos valores de K_I de dois inibidores.....	15
Tabela 3 . Seqüência amino terminal de aminoácidos das cadeias A e B do inibidor	46
Tabela 4. Comparação das seqüências N-terminais de alguns inibidores tipo Kunitz com a cadeia A do inibidor SbKI.....	47
Tabela 5. Comparação das seqüências N-terminais de alguns inibidores do tipo Kunitz com a cadeia B do inibidor SbKI.....	48
Tabela 6. Comparação dos valores de K_I do SbKI com outros inibidores.....	52
Tabela 7. Resultado da desconvolução dos espectros de CD realizados no programa CONTINLL.....	53

Lista de abreviaturas e siglas

Aminoácidos

Abreviação de três letras	Abreviação de uma letra	Aminoácido
Ala	A	Alanina
Arg	R	Arginina
Asn	N	Asparagina
Asp	D	Ácido Aspártico
Cys	C	Cisteína
Gln	Q	Glutamina
Glu	E	Ácido glutâmico
Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Ile	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Lys	K	Lisina
Met	M	Metionina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Trp	W	Triptofano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

Reagentes

ACN	acetonitrila
BAPNA (DL-Bz-Arg-pNan)	"N α -benzoil-D arginine 4 nitroanilide hydrochloride"
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etileno diamino tetra acético
HD-Pro-Phe-Arg-pNan	HD-Proline-Phenilaneline-Arginine-4 nitroanilide
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
TFA	ácido trifluoracético

Colunas e gel

C ₁₈ 250 x 4,6 mm	coluna de fase reversa
Mono-S HR 5/5	coluna de trocador catiônico
Superdex-75 HR 10/30	coluna de exclusão molecular
Tricina-SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

Outras Abreviaturas

AC	atividade anticoagulante
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CD	“Circular Dichroism”
Da	Dalton
DrTI	<i>Delonix regia</i> Trypsin Inhibitor
DTT	ditiotretitol
EB	extrato bruto
EcTI	<i>Enterolobium contorsiliquum</i> Trypsin Inhibitor
g	gravidade
HPLC	“high performance liquid chromatography”
HuPK	“human plasma kallikrein”
kDa	quilo Dalton
K _i	constante de inibição (constante de dissociação do complexo enzima-inibidor)
LITI	<i>Leucaena leucocephala</i> Trypsin Inhibitor
MW	“molecular weight” (massa molecular)
NaCl	cloreto de sódio
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
nd	não determinado
PBS	“Phosphate Buffer Saline”
pI	ponto isoelétrico
PVPP	polivinil polipirrolidona
RMS	“Root Meat Square”
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SbKI	<i>Stryphnodendron barbatiman</i> Kallikrein Inhibitor
SwTI	<i>Swartzia pickelli</i> Trypsin Inhibitor

Lista de Símbolos

A_{220}	absorbância em 220nm
A_{280}	absorbância em 280nm
μL	microlitro
nm	nanometro
nM	nanomolar
pmol	picomol
μM	micromolar

Resumo

Os inibidores de proteases desempenham nas plantas funções como: defesa contra ataque de predadores de sementes, regulação de enzimas endógenas e fontes de proteínas e aminoácidos. Muitos destes inibidores são utilizados em estudos bioquímicos, bem como no tratamento de patologias humanas como inflamação e câncer. Neste trabalho, um inibidor de serinoprotease, presente na semente de *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão), foi purificado, caracterizado e denominado SbKI. Sementes de barbatimão maduras foram trituradas, até a obtenção de uma farinha, e esta foi suspensa em PBS, pH 7,4 (1:5 m/v), sob agitação por 14 horas a 4°C. O extrato foi centrifugado, filtrado e tratado com PVPP, sendo denominado EB, o qual apresentou inibição da coagulação sanguínea e da atividade de algumas serinoproteases. O inibidor SbKI foi purificado utilizando-se três procedimentos cromatográficos: cromatografia de exclusão molecular (Superdex-75, 10/30), troca iônica (Mono-S HR, 5/5), ambas acopladas em um sistema ÄKTA Purifier e fase reversa (C-18, Waters 250 x 4,6mm) acoplada a um sistema HPLC. Em cada etapa de purificação a presença do inibidor foi monitorada pelos testes de atividade inibitória da tripsina e da coagulação, ambos *in vitro*. SDS-PAGE, sob condições redutoras, mostrou que o inibidor é formado por duas cadeias polipeptídicas (cadeia pesada e leve) unida por ligação dissulfeto. As cadeias foram separadas pela cromatografia de fase reversa após serem reduzidas e alquiladas. Suas seqüências N-terminais foram determinadas pela degradação de Edman, em seqüenciador automatizado, apresentando alta identidade sequencial com inibidores do tipo Kunitz de outras leguminosas. A determinação da massa molecular do inibidor e de suas cadeias isoladas, foram determinadas por espectroscopia de massa (LC/ESI-MS system) mostrando massas moleculares de 19.570Da, 15530Da e 4040Da, respectivamente. A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) revelou que o inibidor é formado predominantemente por elementos β e estruturas desordenadas. SbKI foi estável a variações de pHs (2-12) e temperaturas extremas e a temperatura de transição foi calculada em 73,3°C. A determinação das constantes de inibição (K_I) foi realizada para as serinoproteases tripsina ($K_I = 5,5$ nM) e calicreína plasmática ($K_I = 1,1$ nM).

Abstract

Proteinase inhibitors perform many beneficial roles in plants such as defense against the attack of seed predators, regulation of endogenous enzymes and sources of proteins and amino acids. Many inhibitors are used in biochemistry research, as well as human pathology treatment such as inflammation and cancer. In this work, a serino proteinase inhibitor found in *Stryphnodendron barbatiman* seeds (barbatimão) was purified, characterized and denoted SbKI. Mature barbatimão seeds were ground and suspended in PBS pH 7.4 (1:5 w/v) and stirred for 14 hours at 4°C. The suspension was centrifuged, filtered and treated with PVPP and denoted EB. This EB inhibited blood coagulation and some serine proteinases activities. The inhibitor SbKI was purified by three chromatography step: molecular exclusion (on Supredex-75, 10/30), ion exchange (on Mono-S, 5/5), both connected to AKTA Purifier System and reversed phase (on C-18, Waters 250 x 4.6 mm) connected to HPLC System. In each purification step the presence of inhibitor was monitored, *in vitro*, by trypsin and coagulation inhibitory activity. SDS-PAGE, reduced conditions, showed two polypeptide chains (heavy and light chains) linked by one disulphide bridge. The chains were separated by reversed phase chromatography after reduced and alquilated. The N-terminal sequence were performed on automated protein sequencer by Edman degradation and showed homology with Kunitz type inhibitors from Leguminosae. Molecular weight of inhibitor and its chains were determined by mass spectrometry (LC/ESI-MS System) and showed molecular weight of 19.570Da, 15.530Da and 4040Da, respectively. Circular dichroism spectroscopy showed SbKI is constituted predominantly by β elements and unordered structures. SbKI was stable over extreme ranges of pH (2-12) and temperature and the transition temperature 73.3°C investigated by CD and fluorescence emission spectroscopies. Inhibition constants (K_i) were determined by trypsin ($K_i = 5.5$ nM) and human plasmatic kallikrein ($K_i = 1.1$ mM).

Capítulo 1

Introdução

1.1. Proteases

Proteases (ou peptidases) catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e apresentam ampla distribuição filogenética, estando presente desde vírus e bactérias até em animais e plantas. Em geral, participam de processos de proteólise limitada gerando produtos ativos que estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos importantes, incluindo coagulação sanguínea, cicatrização, fertilização, diferenciação e crescimento celular, sinalização celular, resposta imune, apoptoses, ativação de zimogênios, liberação de hormônios a partir de precursores, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, translocação através de membranas, digestão (intra e extracelular) e “turnover” de proteínas. Estes processos necessitam um rígido controle, pois proteólises descontroladas podem levar à vários estados patológicos como infecção viral, câncer e doença de Alzheimer. Desse modo, inibidores de proteases são potenciais agentes na utilização para intervenção terapêutica em uma variedade de patologias [Alberts *et al*, 2002; Powers *et al*, 2002]. Além disso, diversas doenças causadas por agentes patogênicos como vírus, protozoários, bactérias e fungos são mediadas por proteases, estas desempenhando papel fundamental no processo de infecção como, por exemplo, candidíase, malária e AIDS [Cooper, 2002]. Dessa forma, vem ocorrendo um aumento nos estudos relacionados com os processos que regulam a ação das proteases, bem como dos mecanismos regulados por inibidores protéicos, endógenos e/ou exógenos, que poderiam contribuir de modo significativo sobre os mecanismos moleculares envolvidos nestas patologias.

1.1.1. Classificação das proteases

As proteases são classificadas, levando-se em consideração os resíduos de aminoácidos no sítio ativo, pelo mecanismo de ação e pela similaridade na sequência de aminoácidos. São conhecidas sete famílias: (1) asparticoprotease (asparticopeptidase), (2) cisteinoprotease (cisteinopeptidase), (3) metaloprotease (metalopeptidase), (4) serinoprotease (serinopeptidase), (5) treoninoprotease (treoninopeptidase), como a gama-glutamilttransferase 1, (6) glutamicoprotease (glutamicopeptidase), como a scitalidoglutamico peptidase, e (7) protease de mecanismo catalítico desconhecido, como Lit peptidase; sendo as quatro primeiras famílias as principais [Powers, 2002, Koiwa et al 1997].

Cisteinoproteases estão presentes em todos os organismos vivos e são responsáveis por muitos processos bioquímicos que ocorrem neles, sendo que a principal função fisiológica é a degradação metabólica de peptídeos e proteínas. Elas são caracterizadas por apresentarem uma díade catalítica formada pelos resíduos de cisteína e histidina, uma massa molecular entre 21 e 30 kDa e com atividade hidrolítica máxima entre os pHs 4 e 6,5. Exemplos de cisteinoproteases são: catepsina B (de *Aspergillus*), cruzipainas (*Trypanosoma*), papainas (plantas) e catepsinas lisossomais (mamíferos). [Grzonka et al, 2001].

Metaloproteases pertencem a um grande grupo de hidrolases em que o ataque nucleofílico em uma ligação peptídica é mediado por uma molécula de água ativada por um íon metal (geralmente um íon de zinco, Zn^{++}) que coordena três resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Como exemplos deste grupo estão as carboxipeptidases e termolisina [DeClerck, 2000].

Asparticoproteases são enzimas proteolíticas caracterizadas como tendo valores ótimos de pH baixo, tipicamente apresentam massa molecular em torno de 35kDa e a atividade catalítica é devido à presença de dois resíduos de ácido aspártico no centro catalítico. Há vários exemplos como: renina, catepsina D, pepsina [Cooper, 2002; Simões & Faro, 2004]

Com relação às **serinoproteases**, aproximadamente um terço de todas as proteases pertencem a essa classe e são assim denominadas por possuírem um mecanismo catalítico comum que envolve um resíduo de serina particularmente reativo [Hedstrom, 2002; Voet, 1995]. Sobre esta família será feita uma abordagem pormenorizada, uma vez que esta dissertação versará sobre estudos de inibidores protéicos de serinoproteases.

1.1.2. Serinoproteases

As enzimas desta classe desempenham uma variedade de funções fisiológicas, sejam funções gerais ou específicas, tais como: digestão (como, por exemplo, tripsina e quimotripsina), coagulação sanguínea (como a calicreína e trombina), sistema fibrinolítico (como a plasmina), desenvolvimento, inflamações, ativação do complemento e reprodução [Voet, 1995; Rao, 1991; Jovin, 2004, Guyton, 1997].

Em suas estruturas está sempre presente, no sítio ativo, uma tríade catalítica representada pelos resíduos de Ser 195, His 57 e Asp102 envolvidos na formação do complexo covalente com o substrato [Otlewski, 2001], como mostra a figura 1. Entretanto, recentemente foi descrito serinoproteases com novas tríades catalíticas e díades, incluindo Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His [Hedstrom, 2002].

Dentre os diferentes sistemas protéicos plasmáticos e teciduais em que as serinoproteases atuam, a coagulação sanguínea é um dos exemplos mais interessantes e o selecionamos para ilustrar o fenômeno.

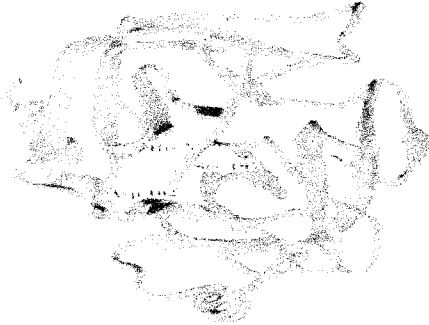


Figura 1. Estrutura da serinoprotease tripsina. Nesta figura estão representados a tríade catalítica (formada pelos resíduos de serina – 195, histidina – 57 e ácido aspártico – 102) e as regiões C e N terminais. Figura retirada de Voet, 1995.

1.1.2.1. Coagulação sanguínea.

Em resposta a ruptura ou lesões vasculares, é iniciada uma série de reações de proteólise limitada (“reações em cascata”), gerando moléculas ativas a partir de precursores protéicos plasmáticos. Os mecanismos que iniciam a coagulação sanguínea podem ser um trauma na parede vascular ou tecidos adjacentes, alteração no sangue, ou contato do sangue com as células endoteliais lesadas ou como colágeno ou outros elementos teciduais abaixo do endotélio do vaso sanguíneo [Guyton, 1997].

O processo de coagulação sanguínea pode ser dividido em 3 etapas essenciais: (1) em resposta a ruptura do vaso ou dano ao próprio sangue, ocorre uma seqüência de reações químicas no sangue envolvendo vários fatores da coagulação sanguínea. O resultado é a formação de um complexo de substâncias ativadas,

chamado de ativador da protrombina; (2) o ativador da protrombina catalisa a conversão da protrombina em trombina e (3) a trombina age como uma enzima que converte o fibrinogênio em fibras de fibrina, e estas envolve as plaquetas, os glóbulos sanguíneos e o plasma para formar o coágulo [Guyton, 1997]. Nesse processo os fatores que promovem a coagulação são chamados de fatores sanguíneos da coagulação e, na maior parte, são formas inativas de enzimas proteolíticas que são ativadas em seqüência, ou seja, a forma ativada de um fator catalisa a ativação do outro fator. As enzimas e os fatores protéicos não enzimáticos são, na maioria, serinoproteases, como, por exemplo, a caliceína plasmática e a trombina. Seus domínios catalíticos se assemelham à tripsina em relação à seqüência e ao mecanismo de ação, embora sejam mais específicos pelos seus substratos [Guyton, 1997; Stryer, 1996; Voet, 1995].

A serinoprotease caliceína é encontrada em células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos e são divididos em dois grupos principais: caliceína tissular ou glandular e caliceína plasmática, diferindo com relação a massa molecular, especificidade pelo substrato, características imunológicas, estrutura gênica e tipo de cinina liberada. A caliceína plasmática é sintetizada no fígado na forma de um precursor (zimogênio) sendo ativado pelo fator XIIa [Pesquero and Bader, 1998; Yousel and Diamandis, 2003; Colman and Schmaier, 1997].

De um modo geral, no processo da coagulação sanguínea considera-se que o ativador da protrombina seja formado por duas vias, embora, na realidade, elas interajam constantemente uma com a outra: (1) a via extrínseca, que se inicia com o trauma da parede vascular e tecidos circunjacentes, e (2) a via intrínseca, que começa no próprio sangue, como está ilustrado na figura 1 [Guyton, 1997; Voet & Voet, 1995].

VIA INTRÍNSECA

VIA EXTRÍNSECA

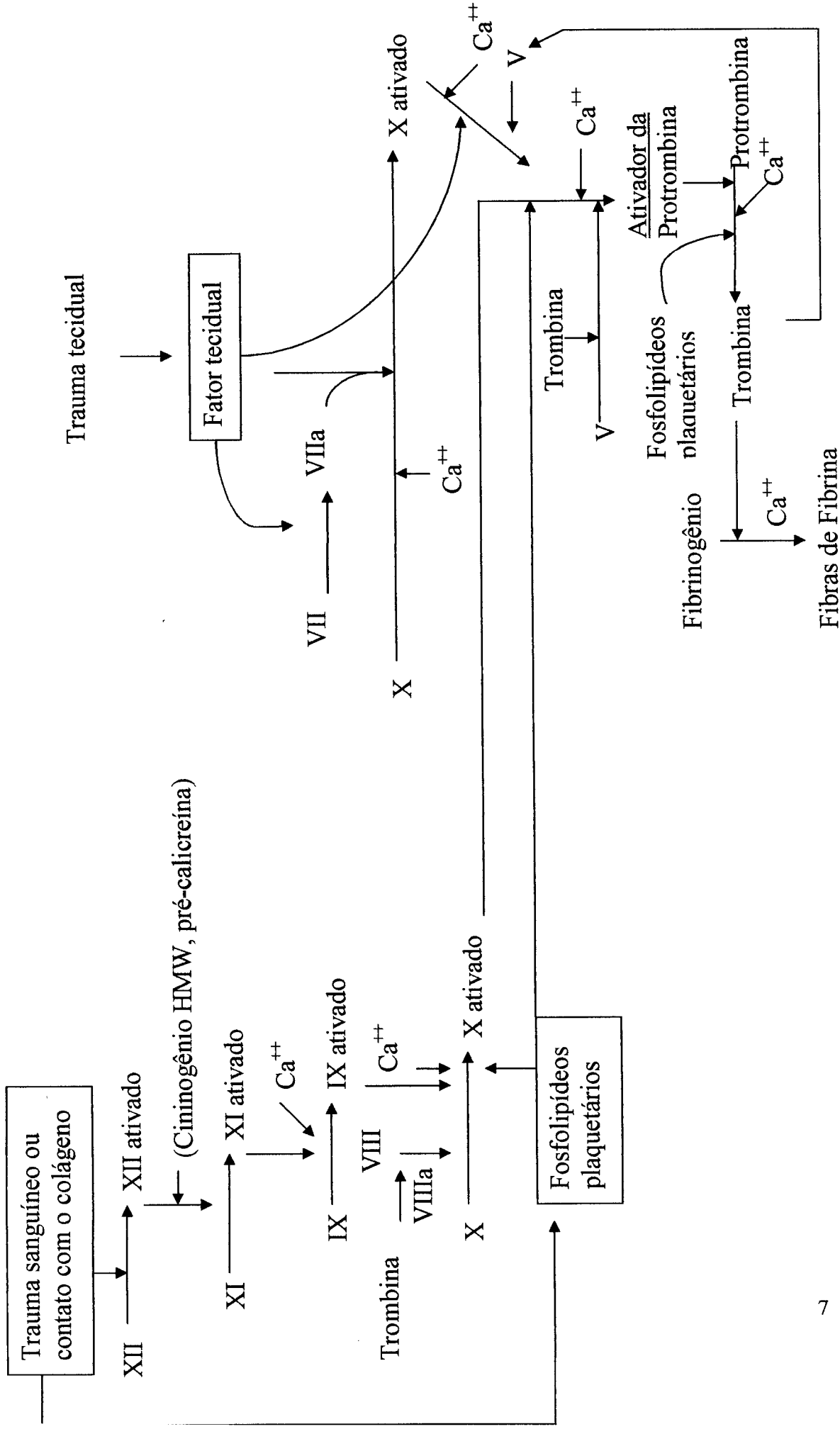


Figura 1. Esquema da cascata da coagulação. Modificado a partir de Guyton, 1997.

Em alguns distúrbios que envolvem a cascata da coagulação (por exemplo, condições tromboembólicas e embolia pulmonar) o uso clínico de anticoagulantes é desejável, a fim de se retardar o processo de coagulação e, inibidores da cascata proteolítica representam um interessante alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Atualmente vários anticoagulantes têm sido desenvolvidos e utilizados para esse propósito como a heparina, a cumarina e a hirudina [Guyton, 1997; Amour, 2004;

<http://www.geocities.com/Athens/Sparta/9758/hemato/hemato.htm>].

Contudo, inibidores protéicos específicos podem atuar como moduladores de partes do processo, auxiliando no tratamento de distúrbios focalizados e ainda sendo úteis nos estudos sobre os mecanismos de ações das enzimas que participam do processo.

1.2. Inibidores de proteases

As enzimas proteolíticas são potencialmente perigosas para o “ambiente protéico” e, dessa forma, suas atividades devem ser muito bem controladas. Para isso os organismos utilizam inibidores de proteases como a principal ferramenta para controlar as atividades proteolíticas, complexando e bloqueando a ação dessas proteases. [Bode & Huber, 2000; Branden & Tooze].

Os inibidores de proteases podem ser de caráter protéico ou não. As proteínas inibidoras de proteases podem ser definidas como substâncias capazes de inibir fortemente enzimas hidrolíticas, *in vitro* ou *in vivo*, através da formação de um complexo estequiométrico e estável (Krauchenco apud Breddam; Bode). Elas estão presentes em inúmeras formas em vários tecidos e fluídos de plantas, animais e microorganismos [Laskowisk & Kato, 1980; Richardson, 1991].

O alto nível de inibidores de enzimas encontrados em sementes de muitas espécies de plantas tem atraído especulações para o seu propósito fisiológico. O significado fisiológico dos inibidores está associado a três funções principais nas plantas que são: agir como estoque ou reserva de proteínas e/ou aminoácidos, (especialmente aminoácidos sulfonados), como regulador de enzimas endógenas ou como agentes defensivos contra animais predadores e pestes como insetos ou microrganismo (patógenos), neste último caso, os inibidores parecem atuar inibindo a atividade proteolítica das enzimas digestivas de insetos herbívoros e suas larvas, indisponibilizando nutrientes e, conseqüentemente, interferindo no seu desenvolvimento e reprodução [Richardson, 1991; Pompermayer, 2001; Ceciliani et al, 1997].

Além dessas funções biológicas naturais (intrínsecas), os inibidores de proteinases podem ser utilizados ou terem outras funções como: (1) utilização como ferramentas em estudos bioquímicos e fisiológicos de funções de proteases [Oliva et al, 1999b]; (2) purificação de enzimas proteolíticas por cromatografia de afinidade [Sampaio et al, 1974]; (3) entender a função de enzimas proteolíticas na coagulação sanguínea [Hayashi et al, 1994; Oliva et al, 2000]; (4) serem utilizados no tratamento de patologias humanas como inflamação, hemorragia [Oliva et al, 2000]; (5) câncer [Kobayashi 2004]; (6) AIDS, (7) hipertensão, (8) doenças amilóides, (9) doenças gástricas, (10) infecções parasitárias [Cooper, 2002], (11) uso clínico em algumas condições tromboembólicas (Guyton, 1997); (12) engenharia genética de plantas (Haq, 2004).

Nesse sentido existe uma vasta literatura sobre inibidores protéicos de proteases que atuam nas classes de proteases descritas acima e alguns serão comentados a seguir.

Haq e Khan publicaram estudo sobre um inibidor presente na semente de *Cajanus cajan* (L.), que inibe as enzimas tripsina e α -quimotripsina e, segundo análise da seqüência N-terminal, assemelha-se aos inibidores do tipo Kunitz, especialmente inibidor de tripsina de soja. Além disso, esse inibidor apresenta estabilidade térmica e a variação de pH e tem predominância de estrutura desordenada [Haq e Khan, 2003].

Mello e colaboradores descreveram um inibidor presente na semente de *Dimorphandra mollis* capaz de inibir as enzimas tripsina ($K_I = 1,7$ nM), calicreína plasmática humana ($K_I = 0,31$ μ M) e plasmina ($K_I = 0,13$ nM), mostrando assim sua ação sobre enzimas envolvidas na coagulação sanguínea. A seqüência N-terminal do inibidor mostra alto grau de identidade seqüencial com outros inibidores do tipo Kunitz [Mello et al, 2002].

Recentemente foi identificado e caracterizado um inibidor de tripsina a partir de semente de *Poecilanthe parviflora*. Esse inibidor é estável a variação térmica e a variação de pH, apresenta um K_I de 0,1 μ M para a tripsina e apresenta identidade seqüencial com outros inibidores do tipo Kunitz. Além disso ele é capaz de inibir significativamente larva de vários insetos, como pode ser verificado no trabalho de Garcia e colaboradores [Garcia, 2004].

Os inibidores de proteases de caráter protéico são divididos em famílias levando-se em consideração a classe de enzimas proteolíticas que inibem. A seguir serão comentados os inibidores das serinoproteases

1.2.1. Inibidores de serinoproteases

Baseando-se no fato de que as serinoproteases estão presentes em diversos processos fisiológicos mencionados anteriormente, fica evidente o interesse no estudo dessa classe de enzimas, bem como de seus inibidores, sendo comprovado pelo montante de trabalhos relacionados com esse assunto (estudos bioquímicos, cinéticos, estruturais, entre outros), muitos desses inibidores originados de sementes de plantas estudados por diferentes grupos no Brasil e exterior, como, por exemplo inibidores de sementes de *Bauhinia bauhinioides* [Oliva *et al*, 2001], *Dimorphandra mollis* [Mello *et al*, 2001], *Dioclea glabra* [Bueno *et al*, 1999], entre outros, como também inibidores de serinoproteases de outras fontes, como, por exemplo, sistema circulatório de mamíferos [Quinsey *et al*, 2004], *Solanum tuberosum L.* [Valueva *et al*, 2000] e *Aplysia dactylomela* [González *et al*, 2004]. Os inibidores de serinoproteases são encontrados em tecidos animais, tecidos de plantas e em microrganismos e que, várias evidências demonstram que deve haver um delicado balanço entre serinoproteases e seus inibidores para o funcionamento normal de inúmeros processos biológicos. Esses inibidores foram principalmente isolados de leguminosas, solanaceas e gramíneas, devido a grande importância econômica dessas plantas [Richardson, 1991; Molinari *et al*, 2003].

O interesse em inibidores de plantas começou na década de 1940, quando Kunitz isolou e purificou uma proteína de soja, que inibia tripsina e a estrutura primária completa de inibidores de proteases do tipo Kunitz a partir de soja foi primeiramente determinada por Koide e Ikenaka em 1973 [Richardson, 1991]. Os inibidores de planta do tipo Kunitz, os inibidores Bowman-Birk, os inibidores de batata do tipo I e II compreendem as quatro classes mais bem estudadas.

Na tabela 1 estão listados os classes de inibidores de serinoproteases descritos na literatura.

Famílias	Ocorrência
Antistasin	Animal
Arrowhead (site 1 e site 2)	Planta
Ascaris	Animal
BBI (Bownam-Birk inhibitor)	Planta
Chelonianin	Animal
Ecotin	Microrganismo
Grasshopper	Animal
Kazal	Animal
Kunitz (BPTI)	Animal
Kunitz (STI)	Planta
Marinostatin	Microrganismo
Batata I (Eglin c e CMTI-V)	Planta
Batata II	Planta
Rapeseed	Planta
Silkworm	Animal
FPI-F (fungal protease inhibitor F)	Fungo
SSI	Microrganismo
Abóbora	Planta

Tabela 1. As famílias de proteínas inibidoras de serinoproteases. Modificado a partir de, Laskowski, 2000.

Os inibidores de serinoproteases são chamados de inibidores canônicos. Eles evitam o acesso de substratos aos centros catalíticos das proteinases por impedimento estérico através da exposição do “loop” do sítio reativo, que se insere dentro do espaço do sítio ativo, simulando um substrato, como de clivagem da ligação peptídica, aproximando e bloqueando a Ser 195, em uma geometria próxima a de Michaelis [Bode, 2000].

Dos inibidores de serinoproteases, os do tipo Kunitz são os mais estudados e sobre eles versará o trabalho que foi desenvolvido nesta dissertação. Eles estão subdivididos em duas subfamílias: (1) inibidores de tripsina do tipo Kunitz de

pâncreas bovino (BPTI) e (2) inibidores de tripsina do tipo Kunitz de soja (STI). Na primeira estão contidos inibidores que apresentam massas moleculares em torno de 6,5 kDa e três ligações dissulfetos, enquanto que na segunda subfamília estão presentes inibidores com massas moleculares em torno de 20 kDa e duas ligações dissulfetos [Wlodawer, 1987].

Os inibidores de plantas do tipo Kunitz são encontrados em grande quantidade em sementes de todas as subfamílias de Leguminosae: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae e também na família Solanaceae. Enquanto a maioria desses inibidores são moléculas de cadeia simples, outros isolados, a partir de sementes pertencentes à subfamília Mimosoideae (Acácia, *Adenantha*, *Albizzia*, *Enterolobium*, *Leucaena*), são compostas por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia longa (designada de cadeia α ou A), de aproximadamente 16 kDa, e uma cadeia pequena (designada de cadeia β ou B), de aproximadamente 5 kDa, ligadas por uma ligação dissulfeto. A formação dessas duas cadeias é o resultado de um processo de proteólise de um precursor de cadeia simples, que ocorre no 140º resíduo, ou próximo deste, após a redução das ligações dissulfetos [Richardson, 1991; Negreiros, 1991; Richardson, 1986; Batista, 1996; Oliva, 2000].

Entretanto, recentemente foi descoberto um inibidor, a partir de semente de *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae, Caesalpinioideae), formado por duas cadeias polipeptídicas, uma com 11 kDa e outra com 9 kDa. [Silva, 2001; Krauchenco, 2004; Krauchenco, 2004].

Assim como os inibidores de outras famílias, os inibidores do tipo Kunitz apresentam a conformação da cadeia principal do segmento P_3-P_3' (notação P_n, P_n' , de acordo com Schechter & Barger, 1967) similares entre si, chamados de

conformação canônica, formando um “loop” de forma convexa que é capaz de reconhecer o sítio ativo côncavo da enzima [Otlewski, 2001]. É nesse “loop” onde está presente o sítio reativo representado pelo resíduo de arginina, presente na maioria dos inibidores. Apesar de ser esse o resíduo de aminoácido presente na maioria dos centros reativos, outros aminoácidos podem estar presentes, mas não frequentemente, como lisina (Acácia confusa) [Wu, 1993], ácido glutâmico [Pando, 2001] e glutamina [Cavalcanti, 2002].

Além da similaridade desse segmento (P_3-P_3'), os inibidores do tipo Kunitz apresentam grande identidade seqüencial e, também, quando há diferença entre os resíduos, estes, em grande parte, são substituições conservativas ou semiconservativas. Também apresentam regiões conservadas ao longo da cadeia, principalmente com relação aos resíduos de cisteína, havendo a possibilidade da formação de ligação dissulfeto, o que garante maior estabilidade estrutural. Isso pode ser verificado em trabalhos, cujas seqüências primárias foram determinadas e realizadas comparações das mesmas [Oliva *et al*, 2000]. Além disso, vários trabalhos recentes com estudos estruturais por cristalografia [Krauchenco *et al*, 2004] e por modelagem por homologia [Sattar *et al*, 2004] têm mostrado que os inibidores de serinoprotease (particularmente do tipo Kunitz), são formados por folhas- β como estrutura secundária e muitos apresentam o enovelamento chamado β -trefoil como estrutura terciária.

Apesar de terem relativamente alta identidade seqüencial, os inibidores do tipo Kunitz, descritos na literatura, apresentam especificidades na inibição de enzimas, bem como variações no grau de inibição (diferentes K_i). Esse fato estimula a contínua busca por novos inibidores, selecionando-os por suas constantes de inibição/enzima específica. Assim, pequenas alterações estruturais em uma mesma

classe de inibidores têm mostrado seletividade para diferentes serinoproteases, ou mesmo a mudança de um resíduo de aminoácido promove alteração na constante de inibição (Hung et al 1994), o que torna as pesquisas nesta área do conhecimento cada vez mais fascinantes e competitivas. Por exemplo, o EcTI (Batista et al, 1996) e LITI (Oliva et al, 2000) apresentam constantes de inibições diferentes para as enzimas tripsina, quimotripsina, fator XIIa e plasmina, apesar de terem alta identidade seqüencial (tabela 2).

	Tripsina	Quimotripsina	HuPK	Fator XIIa	Plasmina
EcTI	1,56 nM	120 nM	5,0 nM	150 nM	18 nM
LITI	25 nM	14 nM	6,3 nM	nd	0,2 nM

Tabela 2. Comparação dos valores de K_I de dois inibidores. Nesta tabela estão listados as constantes de inibição de EcTI e LITI para as enzimas tripsina, quimotripsina, caliceína plasmática humana (HuPK), fator XIIa e plasmina, em que pode-se verificar diferenças significativas, como a inibição da plasmina, com uma diferença de 90 vezes.

EcTI - *Enterolobium contorsiliquum* trypsin inhibitor

LITI - *Lecaena leucocephala* trypsin inhibitor

nd - não determinado

Neste trabalho foi realizado o isolamento, purificação, caracterização estrutural e funcional de um inibidor de serinoprotease, presente nas sementes de barbatimão, do gênero *Stryphnodendron*, pertencente à família Leguminosae, que apresentou K_I para a enzima caliceína de aproximadamente 1 nM.

Capítulo 2

Objetivos

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a presença de inibidores protéicos no extrato salino das sementes de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*), isolá-lo e testar sua especificidade com diferentes serinoproteases, através da determinação de suas constantes de inibição (K_I).

Especificamente estes estudos seguiram as seguintes etapas:

- a) Extração e isolamento das diferentes frações protéicas existentes no extrato salino das sementes de barbatimão, que apresentavam atividade anticoagulante *in vitro*;
- b) Purificação da fração protéica que apresentou maior atividade inibitória do processo da coagulação, nas condições do ensaio realizado;
- c) Determinação de características estruturais do inibidor (seqüência primária parcial, estrutura secundária, estabilidade);
- d) Determinação de K_I para diferentes serinoproteases.

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1. Extração dos inibidores

Os frutos de barbatimão foram coletados na chácara Santo André localizada na Rodovia Washington Luis, Km 221, no município de São Carlos (22°2'S e 47°55'W) [Carta do Brasil ao Milionésimo, 1972^a].

As sementes de barbatimão, após a retirada do tegumento, foram maceradas em um almofariz até a obtenção de uma farinha. Essa farinha foi suspensa em PBS (0,15M de NaCl + 6mM de Na₂HPO₄ pH 7,4), na proporção 1:5 (p/v), sob refrigeração (aproximadamente 4°C) e agitação constante em um agitador magnético por 14 horas. Posteriormente, o material foi centrifugado por 20 minutos, a 12.000 g, 4°C e o sobrenadante foi filtrado em papel (marca Melitta). Nesse filtrado foi adicionado PVPP na proporção de 100mg/mL, sendo agitado por 30 minutos sob refrigeração (4°C) e posteriormente centrifugado por 20 minutos a 12.000 g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi submetido a dialofiltração contra PBS. Após 5 trocas do tampão, cada uma sendo feita a cada 3 horas, a amostra, designada de EB, foi submetida aos ensaios de atividade biológica e procedimento para purificação do princípio ativo. O fluxograma (figura 1), resume as etapas desse procedimento.

3.2. Determinação da concentração de proteína

O método mais comumente usado de determinação de proteína é o método Folin- Lowry. A base do método é a reação de Biureto de proteína com cobre em condições alcalinas (“copper under alkaline conditions”) e redução ácida do Folin-

Ciocalteu “phosphomolybdicphosphotungstic” a “heteropolymolybdenum blue” pela oxidação catalisada pelo cobre dos aminoácidos aromáticos. A reação resulta em uma coloração azulada forte e é mais sensível (faixa de 0,1-1 mg de proteína/mL) que o método de Bioreto. [Harris e Angal, 1933].

A quantificação de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al, 1951), utilizando BSA como padrão.

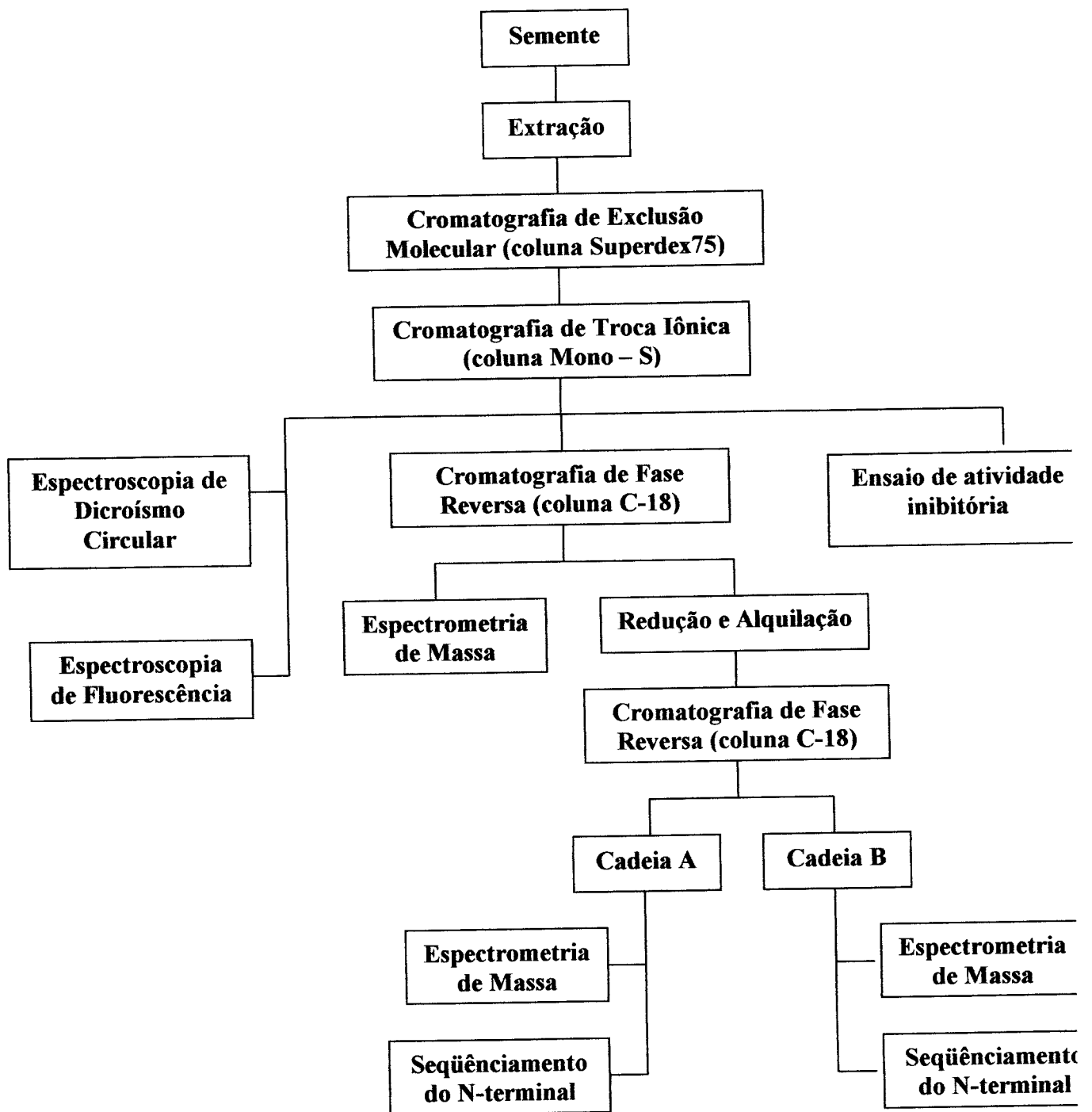


Figura 3. Fluxograma da metodologia empregada para a purificação e caracterização do inibidor.

3.3. Procedimentos cromatográficos

A cromatografia é um método físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase fixa de grande área superficial denominada fase estacionária, e a outra um fluido que percola através dela, sendo, por isso, denominada fase móvel. As etapas para se purificar uma proteína, na maioria dos casos, envolvem diferentes procedimentos cromatográficos. A escolha de um ou outro tipo de procedimento é mais ou menos empírica. E muitos protocolos precisam ser testados antes que seja determinado qual o mais efetivo. Entretanto, atualmente, procedimentos de tentativa e erro podem ser minimizados pela utilização de métodos que permitam conhecer certas propriedades das proteínas presentes em determinado extrato (eletroforese, focalização isoeétrica, etc) anteriormente aos procedimentos cromatográficos.

3.3.1. Cromatografia de exclusão molecular.

O princípio básico desta cromatografia baseia-se nas diferentes massas moleculares em que moléculas são particionadas entre solvente e uma fase estacionária de porosidade definida. O processo de separação é realizado utilizando-se uma matriz de gel porosa (com forma esférica, cuja porosidade é determinada pela quantidade de ligações cruzadas entre os polímeros do material do gel) dentro de uma coluna e rodeado por solvente.

O método de purificação utilizado foi uma coluna Superdex-75 (10/30) acoplada a um sistema ÄKTA Purifier (Amersham Pharmacia Biotech). O EB foi aplicado na coluna previamente equilibrada com 50mL de PBS (aproximadamente

dois volumes da coluna) sob um fluxo de 0,5 mL/min.. A amostra foi eluída com o mesmo tampão e monitorada pela absorvância em 280 nm.

A coluna foi calibrada com os seguintes padrões: BSA (albumina de soro bovino), 66 kDa; ACB (anidrase carbônica bovina), 29 kDa; e Cit C (citocromo-c), 12,4 kDa.

As frações coletadas foram submetidas aos ensaios de inibição da coagulação e inibição da atividade de tripsina.

3.3.2. Cromatografia de troca iônica

Esta cromatografia separa proteínas baseando-se em suas cargas e pode ser usada para separar proteínas que diferem somente em grupos carregados na superfície. Para o uso efetivo da troca iônica na purificação de proteínas a fase estacionária (matriz a qual apresenta grupos inorgânicos carregados ligados) deve, portanto, ser capaz de ligar a proteínas com carga positiva ou negativa. Portanto, as matrizes são derivadas de grupos carregados positivamente para a adsorção de proteínas aniônicas (designada trocadora de ânion) ou grupos carregados negativamente para a adsorção de proteínas catiônicas (designada trocadora de cátions).

Após a eluição da proteína da coluna de exclusão molecular, esta teve seu tampão trocado para Tris (20 mM, pH 8,0) em centriprep 3 (Amicon).

As frações contendo atividade biológica foram reunidas e aplicadas na coluna Mono-S HR 5/5 acoplada a um sistema ÄKTA Purifier (Amersham Pharmacia Biotech). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris (20 mM, pH 8,0) e a amostra aplicada na coluna com o mesmo tampão. Em seguida foi eluída com o

mesmo tampão contendo 0,5 M NaCl, em um gradiente contínuo de 0 – 100% deste tampão, sob fluxo de 1,0 mL/min., monitorado pela absorvância em 280nm e o eluato coletado em frações de 1mL.

As frações eluídas foram analisadas quanto à atividade biológica e somente as frações correspondentes ao segundo pico da curva de absorvância foram reunidas e dialoconcentradas em Centriprep 3, utilizando PBS. Após ensaios de atividade biológica, a amostra foi submetida à eletroforese, medidas de dicroísmo circular (CD) e emissão de fluorescência.

3.3.3. Cromatografia de fase reversa

O mecanismo de separação da cromatografia de fase reversa depende da interação hidrofóbica entre moléculas da fase móvel com ligantes hidrofóbicos da fase estacionária.

A fase reversa envolve o uso de adsorventes hidrofóbicos, tipicamente cadeias alifáticas entre C₈ e C₁₈, ligados a esferas de sílica (convertendo a fase estacionária em uma matriz apolar). As amostras são aplicadas em um solvente aquoso, freqüentemente um ácido diluído, e são eluídas por um gradiente de solvente orgânico miscível como metanol ou acetonitrila.

As frações oriundas da cromatografia em Mono-S, com atividade biológica, foram aplicadas em uma coluna de fase reversa, C-18 (Waters 250 x 4,6 mm), acoplada a um sistema HPLC (Bio Rad). A coluna foi previamente equilibrada com 90% de solvente A (água + 0,1% de TFA) e 10% de solvente B (90% de acetonitrila + 10% de água + 0,1% de TFA). A amostra foi aplicada na coluna com fluxo de 1mL/min. e eluída com gradiente linear do solvente B (de 10% à 80%). A eluição foi

monitorada pela absorvância em 220nm. Duas frações foram eluídas em tempos de retenção de 24 e 26 minutos, sendo este último de conteúdo majoritário. Estas frações eluídas no tempo de retenção de 26 minutos, foram reunidas e liofilizadas para posteriores análises em tricina-SDS-PAGE, espectrometria de massa e análise do N-terminal.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida - tricina

A eletroforese é especialmente útil como método analítico, em que relaciona à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. Sua vantagem é que as proteínas podem ser separadas e visualizadas, permitindo determinar rapidamente o número de espécies de proteínas presentes em uma amostra ou o grau de pureza da mesma, como também a determinação da massa molecular aparente.

Um método eletroforético comumente utilizado para a determinação da pureza e da massa molecular da proteína faz-se uso do detergente SDS. A utilização desse detergente e, mais adequadamente com um agente redutor, permitem que as proteínas e/ou cadeias sejam separadas com base em suas massas moleculares.

Durante o processo de purificação foi utilizado, como método analítico, a eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes para se analisar o andamento do processo. O método usado foi o de tricina-SDS-PAGE [Schägger, e Von, 1987].

Para a preparação das amostras foi utilizado tampão da amostra (Tris-HCL, SDS, glicerol e azul de bromofenol) com agente redutor (β -mercaptoetanol) ou sem este, e todas foram fervidas por 5 minutos.

O gel foi corado com Coomassie brilliant blue R250 0,2% e descorado com uma solução de ácido acético 7%.

As proteínas utilizadas como padrões de massa molecular foram fragmentos de mioglobina com massas moleculares de: 16.950 kDa, 14.404 kDa, 10.700 kDa, 8159 kDa, 6.214 kDa, 2512 kDa, além de glucagom (3.480 kDa).

3.5. Determinação da focalização isoeletrica (IEF)

A superfície de moléculas protéicas é coberta por grupos carregados positiva e negativamente. Acima do ponto isoeletrico (pI) a superfície é carregada negativamente e, portanto, moléculas carregadas igualmente são repelidas uma das outras; abaixo do pI a carga total será positiva e novamente, moléculas carregadas igualmente serão repelidas uma das outras. Entretanto, no pI da proteína as cargas positivas e negativas na superfície de uma molécula cancelam-se, a repulsão eletrostática entre moléculas individuais não ocorre e atrações eletrostáticas entre as moléculas podem acontecer, resultando na formação de um precipitado. A focalização isoeletrica é uma técnica utilizada para determinar o ponto isoeletrico de uma proteína, em que envolve um gradiente de pH em um gel, permitindo que as proteínas migrem em um campo elétrico a um ponto no sistema onde o pH seja igual ao ponto isoeletrico dela. [Scopes;1994; Harris & Angal,1993].

A amostra submetida à determinação do pI foi o material retido aos 26 minutos (coluna C-18). O pI foi determinado em um equipamento sistema PhastSystem (Pharmacia), em que, uma alíquota de 4 μ L de amostra com uma concentração de 2 mg/mL foi aplicado em um gel PhastGel IEF 3-9, o qual permite a determinação do pI situado no intervalo de 3 a 9. A determinação do pI do inibidor

foi realizada sob condições padrão do equipamento e a coloração foi realizada com Coomassie blue (R250).

3.6. Redução e alquilação dos resíduos de cisteína e separação das cadeias

Para a separação das duas cadeias polipeptídicas foi utilizado o método de redução e alquilação de resíduos de cisteína segundo o método descrito por Friedman *et al* (1970).

A amostra utilizada para a reação foi o segundo pico da C-18. Aproximadamente 2nmol de proteína foram dissolvidas em 0,3 mL de tampão (Tris-HCl 0,25M pH 8,5 contendo 1mM de EDTA, 6M de guanidina e 5 μ L de β -mercaptoetanol) e incubado por 3 horas, na ausência de luz, a 37°C sob atmosfera de nitrogênio. A alquilação da proteína foi realizada adicionando-se 5 μ L de 4-vinilpiridina, sendo incubado por 90 minutos nas mesmas condições descrito anteriormente. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida por acidificação com ácido acético glacial (20 μ L) e depois centrifugada por 2 minutos a 16.000 g e injetada na coluna de fase reversa.

As cadeias foram separadas na coluna de fase reversa, C-18, previamente equilibrada com um sistema de solventes TFA/ CH₃CN (A=0,1% TFA em água e B = 0,1% TFA em CH₃CN), com um fluxo de 1mL/min. e a eluição foi realizada com gradiente linear do solvente B (condição inicial de 5% do solvente B em 5 minutos, de 5% a 60% em 60 minutos, de 60% a 100% em 15 minutos, 100% durante 5

minutos e de 100% a 5% em 7 minutos). Esta cromatografia foi monitorada pela absorvância em 220 nm.

Após a eluição as frações foram coletadas, reunidas, liofilizadas e a proteína foi mantida em água. Posteriormente foram determinadas as massas moleculares, bem como a análise do N-terminal.

3.7. Análise do N-terminal

As amostras correspondentes às frações 37 e 54 eluídas da coluna de fase reversa foram analisadas em um seqüenciador automático de proteínas.

Uma alíquota contendo entre 200 e 300 pmol do inibidor e de cada cadeia purificada, em água e Sequa-Brene (Sigma-Aldrich), foi aplicada em um disco de fibra de vidro especial (Wako, Osaka, Japão), previamente tratada com Sequa-Brene. A análise da seqüência do N-terminal foi realizada pelo método de degradação de Edman, em um seqüenciador automatizado de proteínas, PPSQ-23A Shimadzu (Kyoto, Japan). Os procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante.

3.8. Determinação da massa molecular da proteína por espectrometria de massa

Foram determinadas as massas moleculares das frações oriundas da cromatografia de fase reversa, antes (fração 26 – correspondente a proteína nativa) e

depois (frações 37 e 54 – correspondente as cadeias) da reação de redução e alquilação.

A determinação das massas moleculares do inibidor e das cadeias que a constitui, foi realizada pela técnica “electrospray ionization ion-trap” utilizando um espectrômetro de massa acoplado a um cromatógrafo: Waters LC/ESI-MS.

Essas medidas foram realizadas pelo professor Dr. Antônio Miranda do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP –EPM.

3.9. Testes de atividades biológicas

3.9.1. Atividade inibitória da coagulação

Desde a extração e em cada passo cromatográfico foi necessário monitorar a presença da atividade da proteína. Para isso foi feito, após cada etapa de purificação, o teste de atividade anticoagulante, pois se houvesse perda da atividade, seria necessário adotar outra estratégia.

A atividade anticoagulante foi determinada *in vitro* utilizando plasma citratado. Amostras de sangue foram coletadas de doadores sadios e a estas foram adicionados citrato de sódio (150 mM), na proporção de 10:1. Após homogeneização o sangue foi centrifugado a aproximadamente 1000g por 5 minutos a 25°C, e o sobrenadante separado e utilizado no ensaio. 50 µL de amostra foi incubada com o mesmo volume de plasma a 37 °C por 30 minutos, a seguir foi adicionado 50 µL de cloreto de cálcio (20 mM), homogeneizado e inicia-se a medida do tempo de

coagulação. O controle foi feito substituindo-se a amostra pelo tampão. O tempo de coagulação foi determinado na presença e na ausência de inibidor.

3.9.2. Atividade inibitória da atividade enzimática da tripsina

A atividade inibitória de tripsina foi determinada, *in vitro* e em duplicata, pela medida do resíduo da atividade hidrolítica de tripsina para o substrato sintético BAPNA. Em cada tubo de ensaio foi colocado 50 μL de tripsina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl_2) e 50 μL da amostra (no controle foi colocado tampão Tris) sendo incubado por 10 minutos a 37°C. Posteriormente foram adicionados 900 μL de BAPNA (0,32 mM de BAPNA em Tris) e novamente incubado por 30 minutos a 37°C. Após o tempo de incubação a reação foi interrompida adicionando-se 100 μL de HCl 15%(V/V). A hidrólise do substrato foi monitorada em leitura espectrofotométrica (A_{405}).

3.10. Estudos estruturais

3.10.1. Análise de Dicroísmo Circular

Dicroísmo circular (CD) é a propriedade que uma molécula quiral apresenta em absorver diferentemente luz circularmente polarizada à direita e à esquerda. Essa característica, presente em proteínas e peptídeos, pois são moléculas que apresentam centros quirais (carbono α) ao longo da cadeia principal, é utilizada em

espectroscopia de dicroísmo circular, a fim de se caracterizar e quantificar estruturas secundárias (como hélice α , folha β , “turns” e estruturas randômicas) presentes nessas moléculas. Além disso, pode ser utilizada no estudo de mudanças conformacionais (devido a variações ambientais, como variação de pH e temperatura), interação de ligantes e desnaturação e renaturação de proteínas [Cantor e Schimmel, 1980; Kelly and Price, 1997].

Na aplicação desta técnica, o feixe plano polarizado é decomposto por um modulador (usualmente um cristal piezoelétrico, como o quartzo) em duas componentes: luz circularmente polarizada à direita, R, e luz circularmente polarizada à esquerda, L. Se depois da passagem através da amostra os componentes não são absorvidos (ou são absorvidos no mesmo grau) a combinação das componentes regeneraria a radiação polarizada no plano original. Entretanto, se uma das componentes é absorvida pela amostra em uma intensidade maior que a outra, a radiação resultante (componentes combinados) estará elipticamente polarizada, ou seja, o resultado seria uma elipse. Dessa forma, o dicroísmo circular pode ser definido como a diferença entre a absorção das componentes polarizadas à esquerda e à direita (ΔA) [Kelly and Price, 1997; Fasma, G.D., 1996].

Na prática, o espectropolarímetro não recombina as componentes, mas detecta as duas componentes separadamente. Ele então mostrará o dicroísmo a um dado comprimento de onda expresso tanto como a diferença na absorbância das duas componentes ($\Delta A = \Delta_L - \Delta_R$) ou como a elipsidade em graus (θ), dado por: $\theta = \tan^{-1}(b/a)$, onde a e b são os eixos maiores e menores da elipse resultante. Existe uma simples relação numérica entre ΔA e θ (θ em graus), isto é, $\theta = 32,98 \Delta A$ [Kelly and Price, 1997; Fasman, G.D., 1996].

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Instruments, Japão) utilizando cubeta cilíndrica de quartzo de 0,1cm de caminho óptico. A amostra analisada foi o eluato da cromatografia de troca iônica (item 3.3.2.), em PBS, concentrada a 2,2 mg/mL e depois diluída no mesmo tampão (PBS pH 7,4) a uma concentração de 0,2 mg/mL. Os espectros foram coletados em um intervalo de 196 a 250 nm, a aproximadamente 25°C (temperatura ambiente) com uma média de 16 varreduras.

A estimativa do conteúdo de estrutura secundária foi feito através do programa CONTIN [Sreerama & Wood, 2000), em que emprega métodos de desconvolução, mostrando o tipo de estrutura, bem como a porcentagem da mesma.

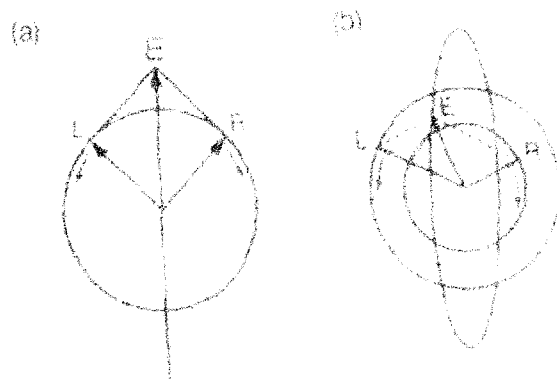


Figura 4. Origem do efeito de dicroísmo circular. Decomposição do feixe plano polarizado em duas componentes circulares à esquerda (L), e à direita (R), antes e depois de passar pela amostra. Modificado a partir de Fasman.

3.10.2. Análise da estabilidade do inibidor em diferentes pHs por CD

A amostra utilizada, bem como o equipamento e as condições para análise da estabilidade foram às mesmas do item anterior, entretanto a amostra foi diluída em diferentes tampões com pHs diferentes. Estes foram:

- * 20 mM de tampão glicina contendo 50mM de NaCl em pH 2,5
- * 20 mM de tampão acetato de sódio contendo 50mM de NaCl em pH 4,0
- * 20 mM de tampão fosfato de sódio contendo 50mM de NaCl em pH 6,0
- * 20 mM de tampão Tris-HCl contendo 50mM de NaCl em pH 8,0
- * 20 mM de tampão borato de sódio contendo 50mM de NaCl em pH 10,0
- * 20 mM de tampão borato de sódio contendo 50mM de NaCl em pH 12,0

3.10.3. Análise da estabilidade do inibidor em diferentes temperaturas por CD

As medidas de CD foram realizadas no mesmo equipamento como descrito no item 3.10.1.. A amostra analisada foi o eluato da cromatografia de troca iônica (item 2.2.2), em PBS, com uma concentração de 0,8 mg/mL e depois diluída em água chegando a uma concentração de 0,16 mg/mL. Os espectros foram coletados em um intervalo de 250 a 196 nm, com uma média de 16 varreduras e variando a temperatura de 5° a 85 °C sendo feita a medida a cada 5°C.

Posteriormente as análises dos espectros de CD, foram realizadas medidas mais refinadas, ao redor da temperatura de transição, compreendendo na faixa de temperatura de 66°C a 90°C e variando em 2°C cada medida.

3.10.4. Análise de fluorescência estática

É possível caracterizar macromoléculas biológicas por emissão de fluorescência e verificar mudanças conformacionais discretas no microambiente dos grupos fluorescentes (fluoróforos) naturais como triptofano, tirosina e fenilalanina.

A técnica se baseia na relação absorção/emissão de fótons por uma dada substância. A absorção de luz por um determinado cromóforo excita seus elétrons do estado fundamental S_0 para o estado excitado S_1 . A partir desse estado, o excesso de energia é dissipado de várias formas, como reações fotoquímicas, decaimento radioativo com produção de fluorescência, e decaimento não radioativo por vários mecanismos de supressão sendo as duas últimas formas os dados que nos fornecem informações estruturais nas proteínas [Eftink, 1991].

Em proteínas que contém os três aminoácidos aromáticos, a fluorescência é usualmente dominada pela contribuição dos resíduos de triptofano, pois tanto sua absorbância quanto seu rendimento quântico, são consideravelmente maiores que os respectivos valores para a tirosina e fenilalanina.

As medidas de fluorescência foram feitas em um fluorímetro ISS K2 (ISS, Fluorescence Analytical and Biomedical Instrumentation – Illinois/USA) utilizando cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico. A amostra analisada foi o eluato da cromatografia de troca iônica, concentrada a 2,2 mg/mL e depois diluídas em PBS e nos diferentes tampões com pHs diferentes (como no item anterior) a uma concentração final de 0,07 mg/mL.

As amostras foram excitadas com comprimento de ondas de 295 nm e os espectros de emissão foram monitorados no intervalo de 305 a 450 nm.

3.11. Ensaios de inibição para determinação do K_I

3.11.1. Determinação do K_I para a tripsina

A atividade inibitória do inibidor foi acompanhada pela dosagem de atividade residual da enzima tripsina pela hidrólise do substrato BAPNA. Nos ensaios realizados em meio de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 0,15M NaCl e 0,02 % CaCl_2 (v/v), 20 μL de tripsina bovina [2,08 μM] foram pré-incubados, a 37°C, por 10 minutos, com concentrações crescentes do inibidor. Em seguida efetuou-se a adição de 25 μL do substrato BAPNA [10 mM] em um volume final de 250 μL , prosseguindo-se a incubação por 20 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 40 μL de ácido acético 40 % (v/v) e as dosagens realizadas em placas de Elisa.

A hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada em leitura espectrofotométrica (A_{405}) da p-nitroanilida liberada do substrato em espectrofotômetro Packard (modelo SpectraCount). A atividade inibitória foi calculada pela determinação da atividade residual de tripsina no ensaio.

3.11.2. Determinação do K_I para a calicreína plasmática humana

A atividade inibitória do inibidor foi acompanhada pela dosagem de atividade residual da enzima calicreína plasmática humana pela hidrólise do substrato HD-Pro-Phe-Arg-pNan. Nos ensaios realizados em meio de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 0,15M NaCl e 0,02 % CaCl_2 (v/v), 30 μL de HuPK [40 μM] foram

pré-incubados, a 37°C, por 10 minutos, com concentrações crescentes do inibidor. Em seguida efetuou-se a adição de 25 µL do substrato HD-Pro-Phe-Arg-pNan [1,0 mM] em um volume final de 250 µL, prosseguindo-se a incubação por 20 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 40 µL de ácido acético 40% (v/v) e as dosagens realizadas em placas de Elisa.

A hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada em leitura espectrofotométrica (A_{405}). A atividade inibitória foi calculada pela determinação da atividade residual de HuPK no ensaio.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1. Atividade Anticoagulante

Após obtenção do extrato salino (1:5 p/v), denominado de Extrato Bruto (EB), este foi dialisado em membrana com porosidade que permitia a passagem de compostos abaixo de 3 kDa, durante 8 horas. A quantidade de EB necessária para impedir a coagulação do plasma citratado foi de 50 μ L, por um período maior que 2 horas.

O EB foi fracionado através de vários procedimentos cromatográficos, descritos a seguir, chegando-se a obtenção de uma fração protéica purificada que foi caracterizada bioquímica e estruturalmente pela análise do N-terminal, estudos espectroscópicos e por ensaios de inibição da atividade de diferentes proteases.

4.2. Cromatografia de exclusão molecular

O EB foi aplicado na coluna Superdex-75, eluída e equilibrada com PBS. Esta filtração separou o EB em quatro picos, que foram submetidos a testes de atividade inibitória da coagulação e de inibição da atividade tripsínica. Dos quatro picos testados somente o segundo apresentou atividade inibitória de proteases. A massa molecular (MM) aparente desta fração corresponde a 20 kDa, como verificado pela calibração da coluna de Superdex-75, figura 4.

A análise do segundo pico em Tricina-SDS-PAGE mostrou uma banda em torno de 20kDa, sem redução, que coincide com a MM aparente observado na coluna de filtração. Duas bandas, uma em torno de 15kDa e outra em torno de

5kDa, foi observada após redução, bem como a diminuição significativa dos contaminantes como mostrado na figura 5.

A presença de duas bandas após redução e de apenas uma banda sem redução (e esta com uma massa molecular correspondente ao somatório das outras duas) indica a presença de uma proteína formada por duas cadeias polipeptídicas unidas por ligação dissulfeto. Essa informação está de acordo com valores descritos na literatura para vários inibidores de proteínas do tipo Kunitz encontrados em Leguminosae [Oliva et al, 2000] e [Richardson, 1991].

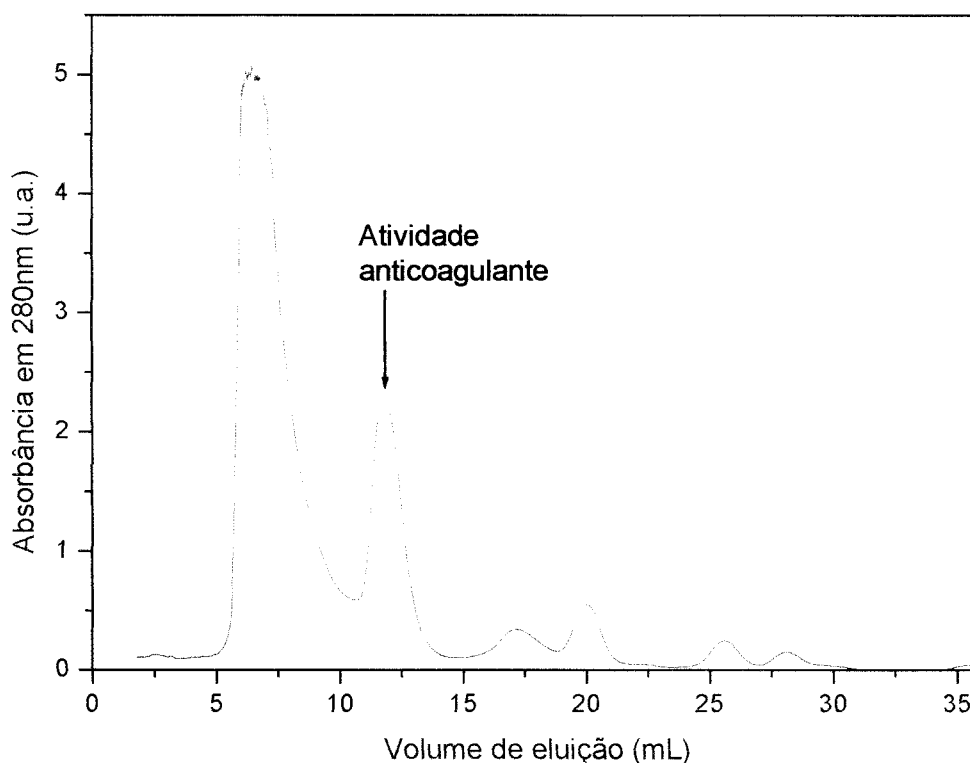


Figura 5. Perfil cromatográfico na coluna de exclusão molecular - coluna Superdex-75 (30 x 10 mm), sistema ÄKTA Purifier. A amostra aplicada (1.0 mL de EB) foi eluída com PBS, pH 7.4, com um fluxo de 0,5mL/min. Teste de atividade foi realizado e somente o segundo pico apresentou um resultado positivo.

Durante os processos de extração e purificação do inibidor foram realizadas análises de SDS-PAGE em cada passo, a fim de se monitorar a presença do inibidor, bem como o grau de pureza da amostra. No gel de poliacrilamida (figura 5), em cada coluna (de 2 a 9) foram aplicada amostra de cada passo de purificação. Pode-se verificar a redução gradual de contaminantes (da esquerda à direita), assim como a presença de uma proteína formada por duas cadeias polipeptídicas (heterodímero) e unidas por ligação dissulfeto. Interessante notar que mesmo antes das frações serem submetidas a redução, as mesmas já apresentam uma certa quantidade de cadeias separadas. Após serem submetidas à redução, nota-se a presença das duas bandas de MM ao redor de 15 e 6 kDa.

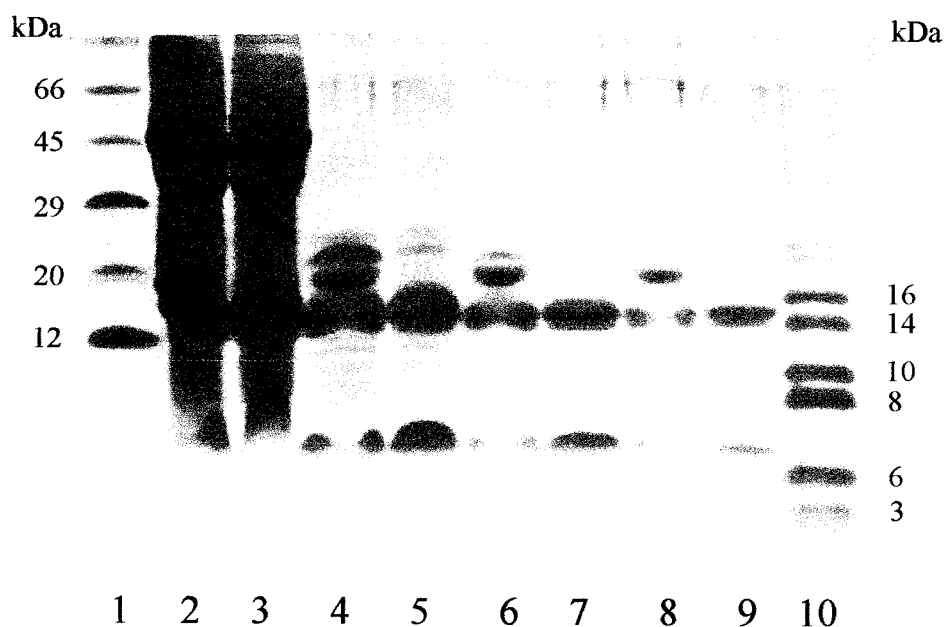


Figura 6. SDS-PAGE mostrando o resultado dos passos de purificação do inibidor. Tricina-SDS-PAGE 16% corado com Coomassie blue: (1) Marcador de alta massa molecular em kDa; (2) EB; (3) EB reduzido; (4) Segundo pico da Superdex75; (5) Segundo pico da Superdex 75 reduzido; (6) Segundo pico da Mono-S; (7) Segundo pico da Mono-S reduzido; (8) Segundo pico da C-18; (9) Segundo pico da C-18 reduzido; (10) Marcador de baixa massa molecular em kDa.

4.3. Cromatografia de troca iônica

A fração contendo atividade biológica, oriunda da coluna Superdex-75, foi dialisada contra tampão Tris-HCl (20mM, pH 8,0) e aplicada em coluna Mono-S previamente equilibrada. Após eluição isocrática durante 15 minutos, as proteínas ligadas na resina foram eluídas aumentando a força iônica utilizando tampão Tris-HCl (20mM, pH 8,0 contendo 0,5M de NaCl), figura 6. Uma fração foi eluída, antes do gradiente salino, portanto não retida na matriz, e outra foi eluída após ser aplicado o gradiente. Os dois picos foram coletados separadamente e o tampão trocado por dialoconcentração contra PBS. Ambos foram ativos quando submetidos a testes de atividade inibitória da coagulação e inibição de tripsina. A fração contida no segundo pico foi selecionada para ser caracterizada, pois apresentou maior quantidade de atividade inibitória da coagulação, apresentou menor quantidade de contaminantes e também inibiu calicreína. Esta fração foi analisada em SDS-PAGE como mostra a figura 5 e foi denominada *Stryphnodendron barbatiman* Kallikrein Inhibitor (SbKI).

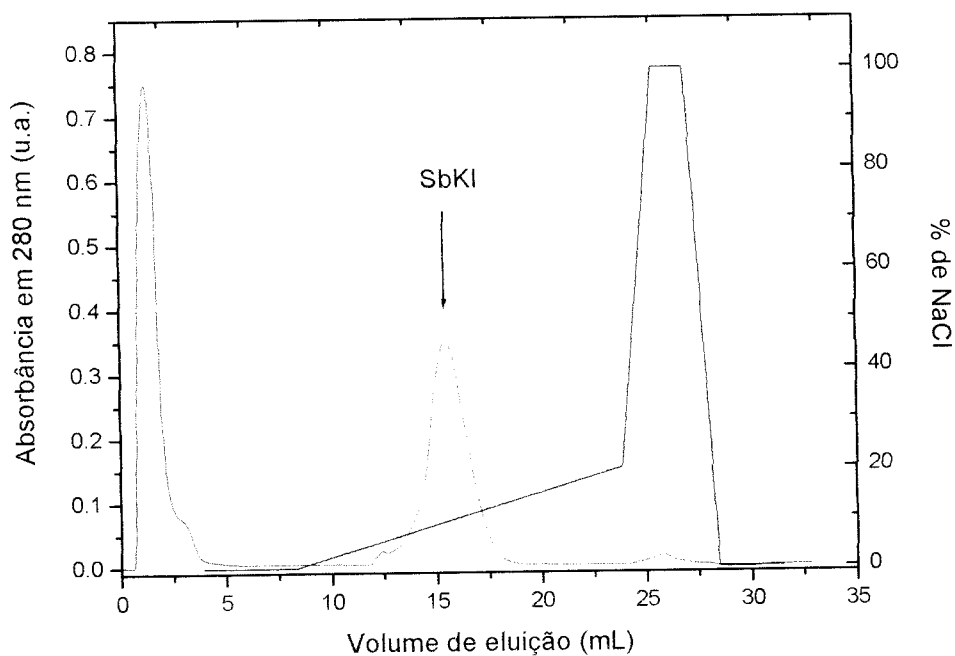


Figura 7. Perfil cromatográfico na coluna de troca iônica - coluna Mono S (HR 5/5, sistema Äkta Purifier). A amostra (1.0mL do 2º pico da Superdex 75) foi eluída com tampão A: 20mM de Tris-HCl em pH 8.0, e tampão B: 20mM de Tris-HCl em pH 8.0 contendo 0,5M NaCl. Com um fluxo de 1mL/min.

4.4. Cromatografia de fase reversa

A fração selecionada após cromatografia em coluna de Mono-S e denominada SbKI foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C-18. A figura 7 mostra o perfil de eluição que originou duas frações, cujos tempos de retenção foram de 24 e 26 minutos, sendo a segunda fração de maior representatividade (majoritária).

As frações correspondentes ao pico majoritário foram liofilizadas para análise em tricina-SDS-PAGE, espectrometria de massa e determinação do N-terminal.

A análise em Tricina-SDS-PAGE mostrou o mesmo perfil das amostras anteriores, uma banda de aproximadamente 20kDa sem redução e duas bandas após a redução (figura 5).

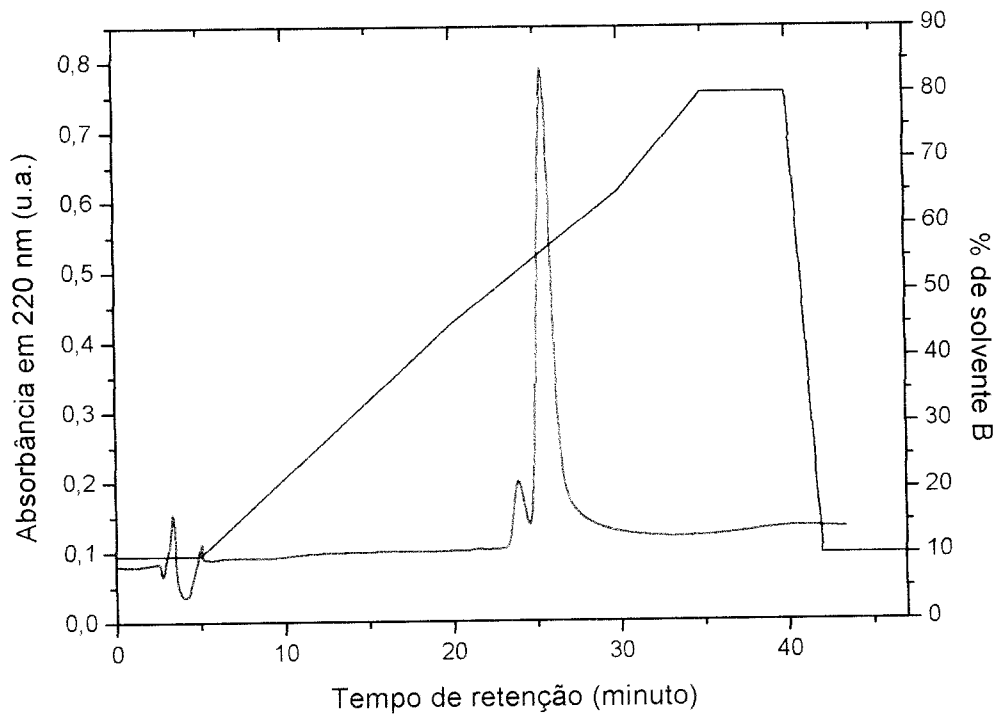


Figura 8. Perfil cromatográfico na coluna de fase reversa - coluna C-18. A amostra (1.0 mL do 2º pico da Mono-S) foi eluída sob gradiente descontínuo de solvente A (0,1% de TFA em água) e solvente B (10% de água + 90% de acetonitrila + 0,1% de TFA) com um fluxo de 1mL/min.

4.5. Separação das cadeias após redução e alquilação.

A eletroforese em gel de Tricina mostrou que o inibidor em estudo apresenta duas bandas após a amostra ter sido tratado com β -mercaptoetanol. Dessa forma, a fração foi submetida à reação de redução para separação das mesmas.

A fração, oriunda da fase reversa, figura 7, com tempo de retenção em 26 minutos, foi reduzida e alquilada; em seguida as cadeias foram separadas na coluna de fase reversa como mostra a figura 8. Duas cadeias foram separadas: cadeias A e B, eluídas nos tempos de retenção: 54 e 38 minutos, respectivamente.

Após as frações terem sido coletadas, reunidas e liofilizadas elas foram analisadas em Tricina-SDS-PAGE, como mostra a figura 9 e submetidas à análise por espectrometria de massa e análise do N-terminal.

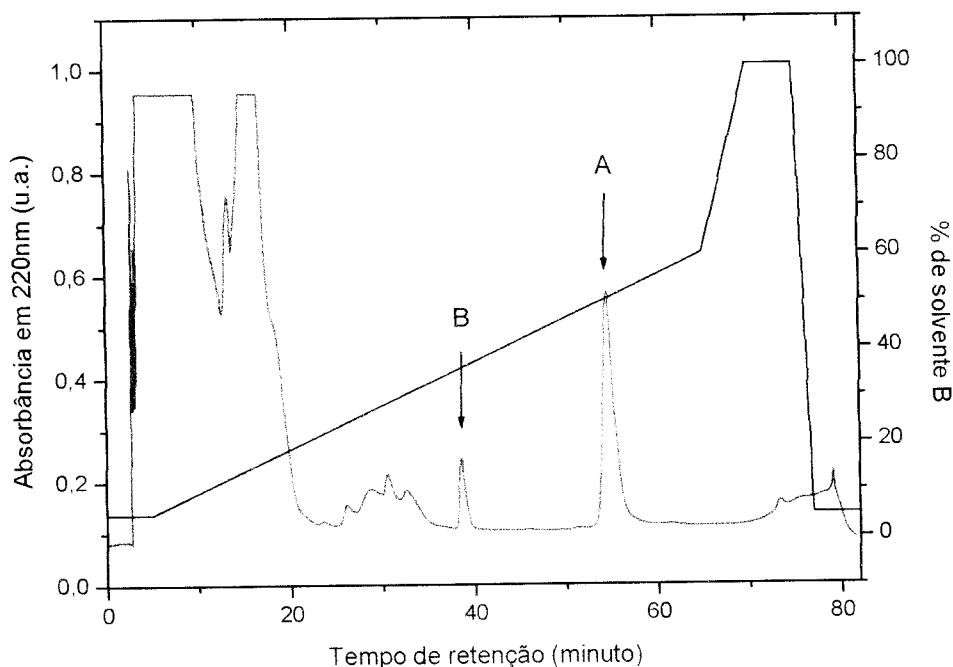


Figura 9. Perfil cromatográfico na coluna de fase reversa (coluna C-18) da proteína após redução e alquilação. A amostra (0,5 mL) foi eluída utilizando gradiente descontínuo dos solventes A (0,1% de TFA em água) e solvente B (10% de água + 90% de acetonitrila + 0,1% de TFA). Com fluxo de 1mL/min. Os dois picos representam as cadeias A e B que constituem a proteína.

A análise em Tricina SDS- PAGE mostra que a proteína é constituída por duas cadeias polipeptídicas e que as reações de redução e alquilação foram eficientes para separá-las. A cadeia eluída com tempo de retenção em 54 minutos (e com maior intensidade) corresponde à cadeia A, ou “pesada”, com uma MM em torno de 15kDa, e a cadeia eluída com tempo de retenção em 38 minutos (e com menor intensidade) corresponde a cadeia B, ou “leve”, com uma MM em torno de 5kDa (figura 9).

Estes resultados são compatíveis com dados da literatura pois muitos inibidores de proteases do tipo Kunitz são formados por duas cadeias, uma α

maior (16kDa) e uma β menor (5kDa), ligadas por uma ligação dissulfeto (subfamília Mimosoideae) [Richardson, 1991], em *Acácia* [Wu & Lin, 1993], *Adenantha* [Richardson *et al.*, 1986], *Albizzia* [Odani, 1979], *Prosopis juliflora* [Negreiro *et al.*, 1991], *Leucaena* [Oliva *et al.*, 2000].

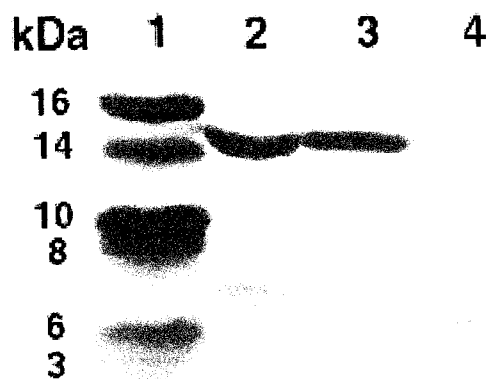


Figura 10 – SDS-PAGE mostrando o resultado da reação de redução e alquilação. (1) padrão de baixa massa molecular em kDa; (2) amostra referente a fração 26 da coluna de fase reversa (antes da reação de redução e alquilação das cadeias); (3 e 4) amostras referentes as frações 54 e 37 da coluna de fase reversa após a reação de redução e alquilação.

4.6. Espectrometria de massa

A análise por espectrometria de massa do inibidor e da cadeia A isolada, mostrou uma massa molecular de 19.570 Da e 15.530 Da, respectivamente, enquanto que a cadeia B teria 4040 Da. A MM é semelhante a outros inibidores do tipo Kunitz, de uma única cadeia, baseado na hipótese de que duas cadeias do inibidor são resultantes de uma clivagem proteolítica ocorrida em um precursor [Negreiros *et al.*, 1991].

4.7. Determinação e análise da seqüência N-terminal

Após a redução, alquilação e separação das cadeias em coluna de fase reversa, as cadeias A e B tiveram sua seqüência N-terminal determinadas, através da degradação de Edman, em seqüenciador automatizado. A tabela 3 mostra as seqüências N-terminal das duas cadeias.

Cadeia A: KELLDADGEL¹⁰LRNGGEYYIL²⁰PVFRGKGGGL³⁰TLAKTGD
 Cadeia B: QSDTCQDLGI¹⁰SIDDENRLL²⁰VVKDGDPLAV³⁰RFVFANR

Tabela 3. Seqüência amino terminal de aminoácidos das cadeias A e B do inibidor

As regiões N-terminais de inibidores são geralmente conservadas e mostram um alto grau de identidade. A comparação da região N-terminal da cadeia A com outros inibidores, mostrou que há muitos resíduos de aminoácidos conservados e que há uma “consensus sequence” de resíduos invariáveis (identificados com asterisco - *) (tabela 4) também presentes em outros inibidores do tipo Kunitz de sementes de Leguminosae e uma identidade maior com os inibidores da subfamília Mimosoideae (tabela 4).

A cadeia A do inibidor apresentou identidade seqüencial com inibidores de *Acacia confusa* (86%), *Prosopis juliflora* (85%), *Adenanthera pavonina* (77%) e *Leucaena leucocephala* (70%) (tabela 4).

A análise de identidade seqüencial e o alinhamento foram realizados, respectivamente, pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Clustal (<http://clustalw.genome.jp/>).

SbKI	KELLDADGELLRNGGEYYILPVFRGKGGGLTLAKTGD
Acacia	KELLDADGDILRNGGAYYILPALRGKGGGLTLAKTGD
Prosopis	QELLDVDGEILRNGGSYYILPAFRGKGGGLELAKTEG
Adenanthaera	RELLDVDGNFLRNGGSYYIVPAFRGKGGGLELARTGS
Leucaena	QVLVDLDGDPLYNGMSYYILPVARGKGGGLELARTGS
	: *:* ** : * ** ***:* . ***** **:* .

Tabela 4. Comparação das seqüências N-terminais de alguns inibidores tipo Kunitz com a cadeia A do SbKI. (1) *Acacia confusa* [Wu e Lin, 1993]; 2-*Prosopis juliflora* [Negreiros *et al*, 1991]; 3-*Adenanthaera pavonina* [Richardson *et al*, 1986]; 4- *Leucaena leucocephala* [Oliva *et al*, 2003]. Alinhamento feito no ClustalW (Expasy)

- * resíduo de aminoácido conservado nos inibidores
- : substituição de resíduo de aminoácido conservativa
- . substituição de resíduo de aminoácido semi-conservativa

A seqüência N-terminal da cadeia B do inibidor apresentou alto grau de identidade seqüencial com os mesmos mostrados para a cadeia A: *Prosopis juliflora* (87%), *Acacia confusa* (92%), *Adenanthaera pavonina* (72%), *Leucaena leucocephala* (77%) (Tabela 5). O inibidor apresenta resíduos de aminoácidos conservados, bem como substituições conservadas e semi-conservadas. O quinto resíduo, como em todos os outros, é uma cisteína, esta que provavelmente esteja fazendo uma ligação dissulfeto com uma das outras cisteína provavelmente presentes na cadeia A, fazendo a ligação entre elas, comprovando a hipótese de que duas cadeias polipeptídicas de um inibidor são ligadas por ligação dissulfeto [Richardson, 1991].

SbKI	-QSDTCQDLGISIDDENNRLLVVKDGDP LAVRFVFANR
Prosopsis	--SDRCKDLGISIDEENNRLLVVKDGDP LAVRFVKANR
Acacia	-DDESCKDLGISIDDENNRLLVVKDGHP LAVRFEKAHR
Adenanthaera	---LECKDLGISIDDDNNRRLAVKEGDP LVVQFVNADR
Leucaena	NHHDDERDLGISIDDQQRLLVVKNGDP LVVQFAKANR
	*:*****:::* *.**:*.**.*:* *.*

Tabela 5. Comparação das seqüências N-terminais de alguns inibidores do tipo Kunitz com a cadeia B do inibidor SbKI. (1) *Prosopis juliflora* [Negreiros *et al*, 1991], (2) *Acacia confusa* [Wu e Lin, 1993], (3) *Adenanthaera pavonina* [Richardson *et al*, 1986], (4) *Leucaena leucocephala* [Oliva *et al*, 2000]. Assim como as outras seqüências, uma característica marcante é a presença do resíduo de cisteína presente no início da seqüência.

Alinhamento feito no ClustalW (Expasy)

- * resíduo de aminoácido conservado nos inibidores
- : substituição de resíduo de aminoácido conservativa
- . substituição de resíduo de aminoácido semi-conservativa

4.8. Determinação do ponto isoelétrico (pI)

A figura 10 mostra o resultado da focalização isoelétrica do inibidor nos intervalos de pI de 3 a 9. O inibidor, representado pela única banda na coluna 2, apresenta um pI em torno de 4,9. Essa característica ácida está de acordo com outros inibidores de tripsina como o de soja (pI = 4,55), e isoformas do *Bauhinia variegata* (pI = 4,85; 5,0 e 5,15)

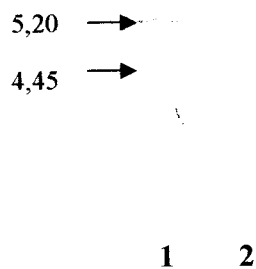


Figura 11 – Determinação do ponto isoelétrico do inibidor. Focalização isoelétrica do inibidor obtido pelo sistema PhastSystem. A coluna 1 refere-se aos padrões de pI e a linha 2 refere-se ao inibidor.

4.9. Ensaio de inibição da atividade enzimática da tripsina e calicreína

4.9.1. Determinação da atividade inibitória da tripsina pelo SbKI

A estequiometria da reação foi determinada utilizando-se uma concentração conhecida de tripsina [$2,08\mu\text{M}$] e concentrações crescentes do inibidor. A figura 11 mostra a curva de inibição da tripsina pelo SbKI, da qual determinou-se a constante de inibição (KI) que foi 5,5 nM.

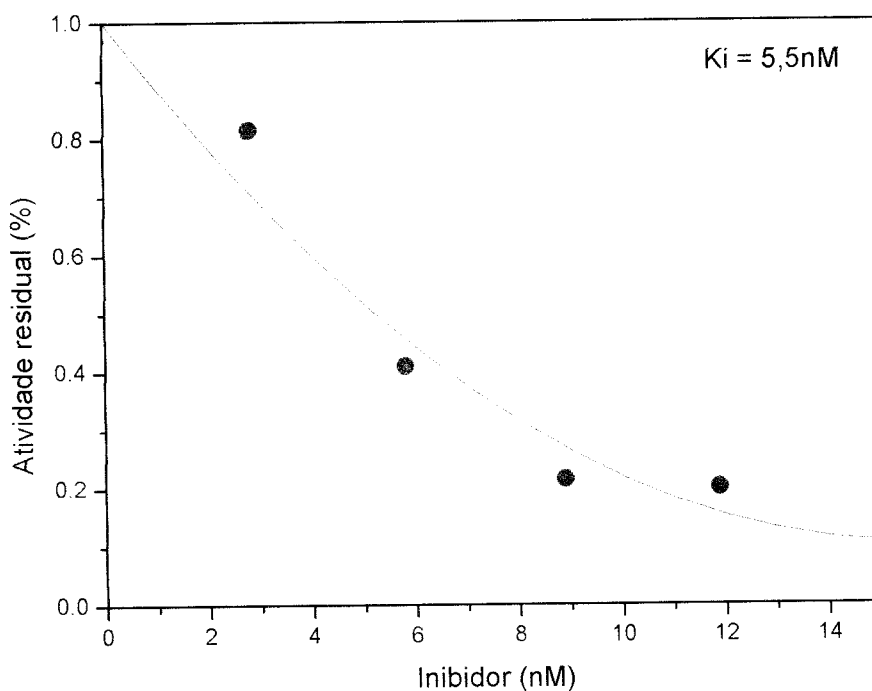


Figura 12. Gráfico mostrando a inibição de tripsina por SbKI. Tripsina bovina ($2,08\mu\text{M}$) pré-incubado (10min. a 37°C em $0,1\text{M}$ de tampão Tris-HCl em pH 8,0) com uma quantidade crescente de SbKI eluída da coluna Mono S (1mg/mL , $50\mu\text{M}$). A atividade residual da tripsina foi medida com DL-Bz-Arg-pNan ($1,0\text{mM}$) como substrato.

4.9.2. Determinação da atividade inibitória da calicreína pelo SbKI

A atividade inibitória do SbKI para a calicreína plasmática humana foi calculada pela determinação da atividade residual de calicreína no ensaio, e a constante de inibição foi calculada em $1,1\text{ nM}$. A figura 12 mostra a curva de inibição, em que concentrações crescentes do inibidor foram colocadas até o equilíbrio da reação de inibição.

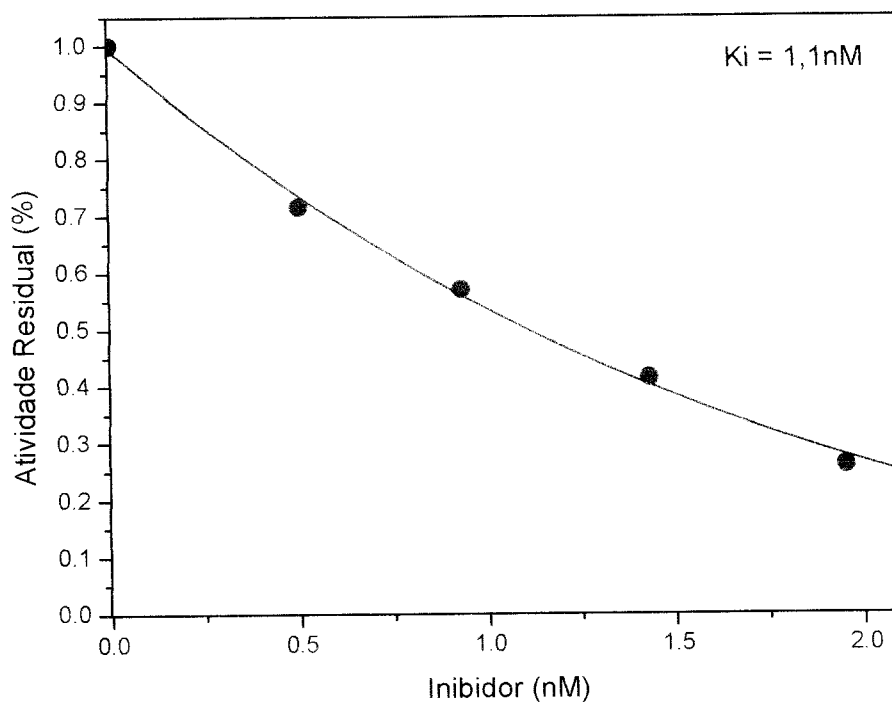


Figura 13. Gráfico mostrando a inibição de caliceína plasmática humana (HuPK) por SbKI. 30 μ L de HuPK (40nM) foi pré-incubado (10 min. a 37°C em 0,05M de tampão Tris-HCl em pH 8,0) com uma quantidade crescente de SbKI eluída da coluna Mono-S (1mg/mL, 50 μ M). A atividade residual da HuPK foi testada com HD-Pro-Phe-Arg-pNan (1.0 mM) como substrato.

Fazendo-se uma análise comparativa entre o SbKI com outros inibidores, pode-se afirmar que ele é um potente inibidor de tripsina e de caliceína plasmática (não foi realizado testes de inibição para outras serinoproteases). Com relação à inibição de tripsina, o SbKI foi, aproximadamente, 4 vezes mais potente em relação ao DrTI, 5 vezes em relação ao LITI e 9 vezes em relação ao SwTI. Comparando-se as inibições de caliceína plasmática, a inibição também foi maior: aproximadamente 5 vezes em relação a DrTI, 6 vezes em relação a LITI e 20 vezes em relação a SwTI, podendo ser verificado na tabela 6.

K _I (nM) inibidor	Tripsina	HuPK	Quimotripsina	Plasmina
SbKI	5,5	1,1		
DrTI	21,9	5,25	n.i.	n.i.
LITI	25	6,3	14	0,32
SwTI	47,4	20,25	123,0	2,52

Tabela 6. Comparação dos valores de K_I do SbKI com outros inibidores.

DrTI - *Delonix regia* Trypsin Inhibitor; LITI - *Leucaena leucocephala* Trypsin Inhibitor;

SwTI - *Swartzia pickellii* Trypsin Inhibitor; n.i. – não inibiu

4.10. Estudos estruturais do SbKI

Os estudos estruturais do SbKI foram realizados através das medidas de dicroísmo circular (CD) e emissão de fluorescência.

O espectro de CD mostrou uma forma típica de proteínas com predominância de folhas β e estruturas desordenadas (figura 13). O espectro foi desconvoluído através do programa CONTINLL (com um banco de quarenta e três proteínas de referência) mostrando predominância de fitas β (paralelas e antiparalelas), voltas (58%) e estruturas desordenadas (42%). As frações de estrutura secundária calculadas estão resumidas na tabela 7.

Esses resultados estão de acordo com a estrutura de outros inibidores do tipo Kunitz, cujas estruturas tridimensionais (por cristalografia) foram determinadas [Krauchenco 2003; Krauchenco, 2004; Onesti, 1991; Vieira, 2004; Hansen, 2004] e apresentam predominância de fitas- β .

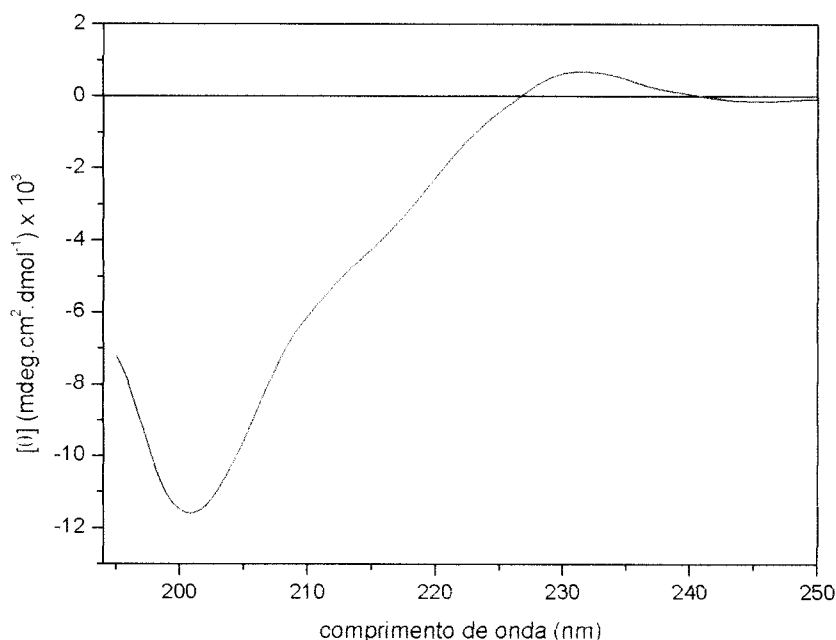


Figura 14. Espectro de Dicroísmo Circular do inibidor SbKI. As medidas foram realizadas utilizando um cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico, fazendo uma varredura de 195 – 250nm, com uma média de 16 medidas.

Estruturas secundárias	Porcentagem
fitas β (paralelas e antiparalelas)	45
voltas β	13
estruturas desordenadas	41

Tabela 7. Resultado da desconvolução dos espectros de CD realizados no programa CONTINLL. Nesta tabela estão os resultados da desconvolução dos espectros de CD realizados com o SbKI, em que mostra a predominância de fitas β e estruturas desordenadas, compatíveis a vários inibidores encontrados na literatura. RMS foi de 1.

O espectro de emissão da fluorescência, após excitação em 295nm, mostrou um máximo em 342 nm, compatível com proteínas que apresentam os resíduos de triptofanos parcialmente expostos ao solvente, figura 14.

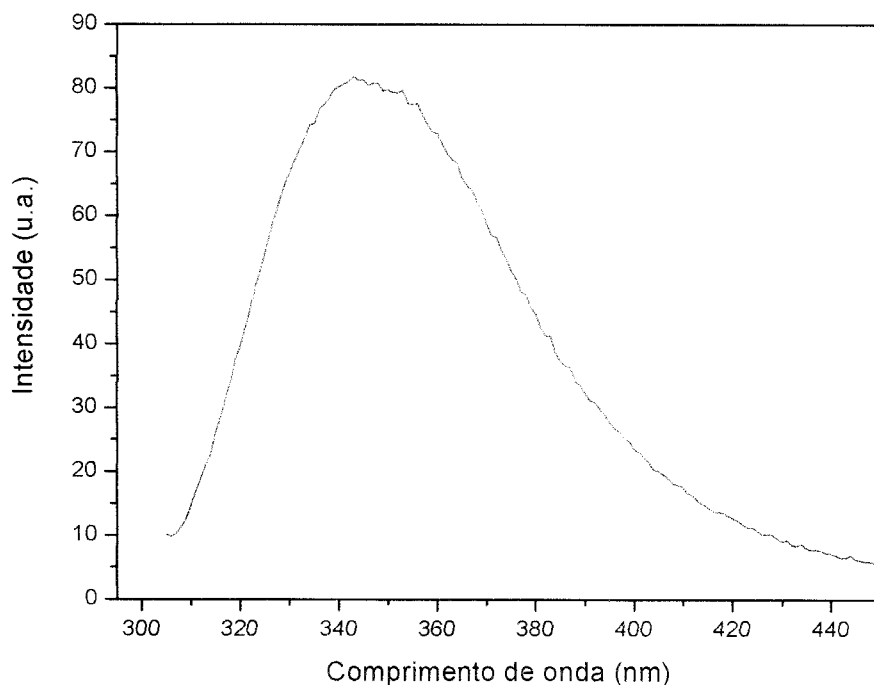


Figura 15. Espectro de emissão de fluorescência do inibidor SbKI. Foi utilizada uma solução protéica de aproximadamente 0,07mg/mL. A excitação foi realizada com comprimento de onda de 295 nm e os espectros de emissão foram monitorados no intervalo de 305 à 450 nm.

4.10.1. Análise da estabilidade do inibidor em diferentes pHs.

A estabilidade estrutural do inibidor também foi estudada em função da variação do pH (de 2,5 à 12,0) e temperatura (5 à 85⁰C) monitorando-se por CD e emissão de fluorescência.

As medidas de CD do inibidor nos diferentes pHs estão mostradas na figura 15 e não apresentaram diferenças significativas em seus respectivos espectros.

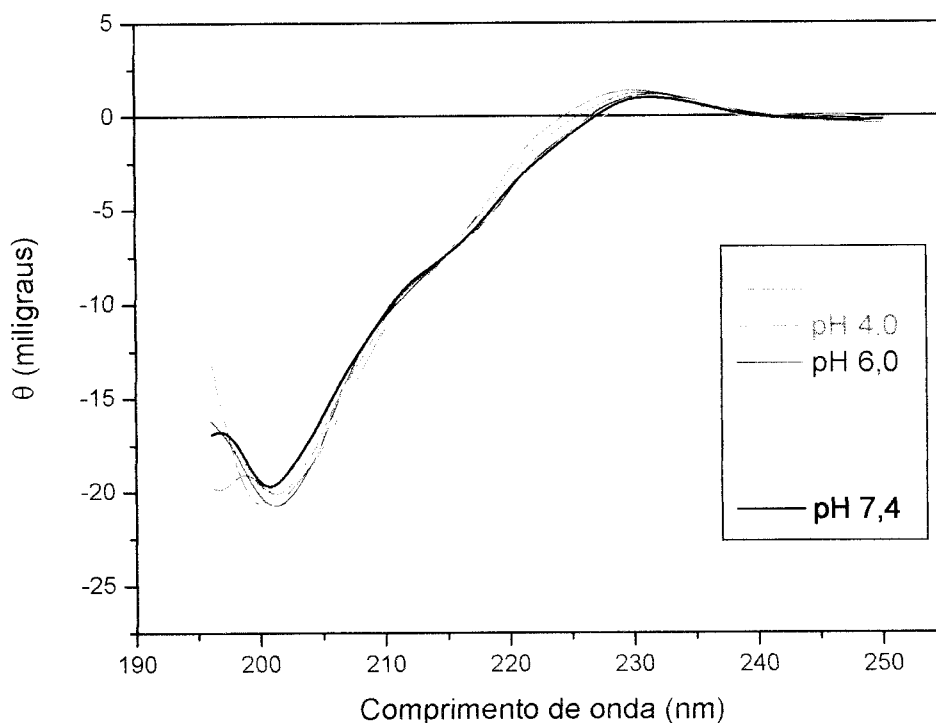


Figura 16. Espectros de CD do inibidor em diferentes pHs. As medidas foram realizadas utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1cm de caminho óptico, a 25°C com uma solução protéica, cuja concentração foi de aproximadamente 0,2 mg/mL. Foram realizadas 16 varreduras em cada medida variando o comprimento de onda de 196 à 250 nm.

Os espectros de emissão de fluorescência, em função do pH, também praticamente não variaram, apresentando máximo de emissão ao redor de 342, como podem serem observados na figura 16.

Estes estudos mostraram que este inibidor é estável em uma ampla faixa de pH e temperatura, podendo exercer um papel fisiológico importante no processo de germinação da semente, regulando a ação de enzimas tanto da própria planta como de microrganismos e parasitas que poderiam interferir no processo.

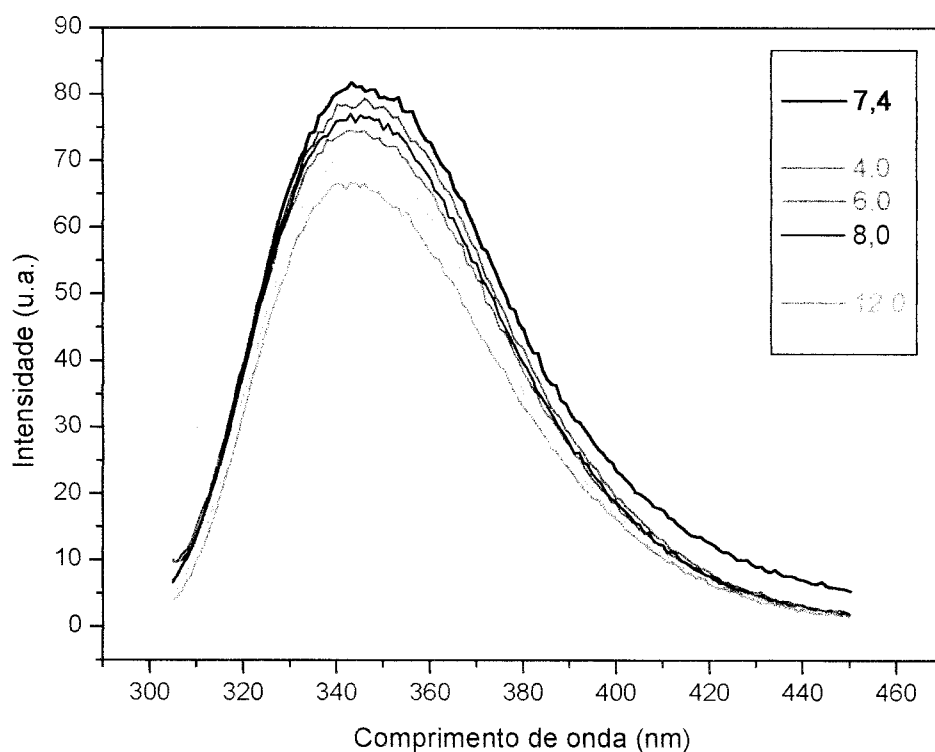
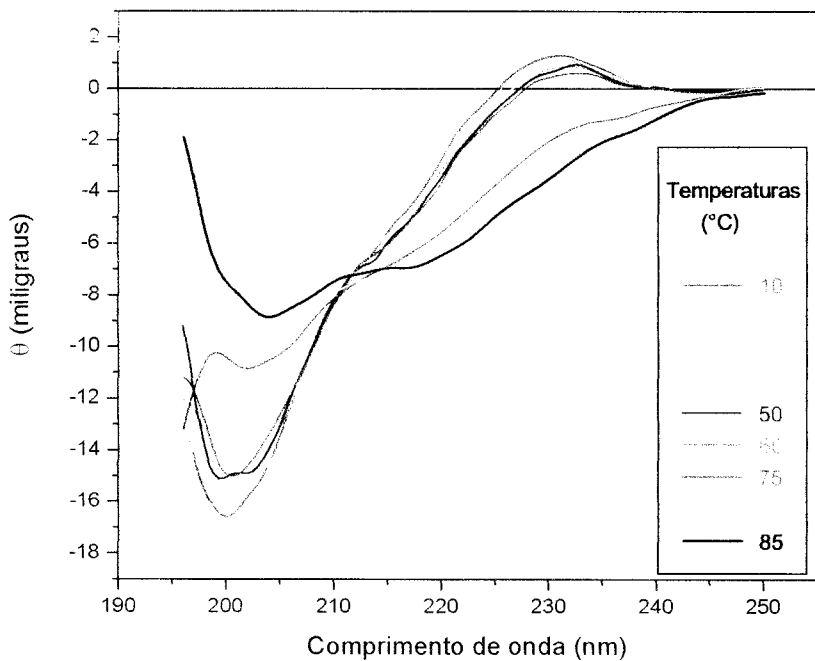


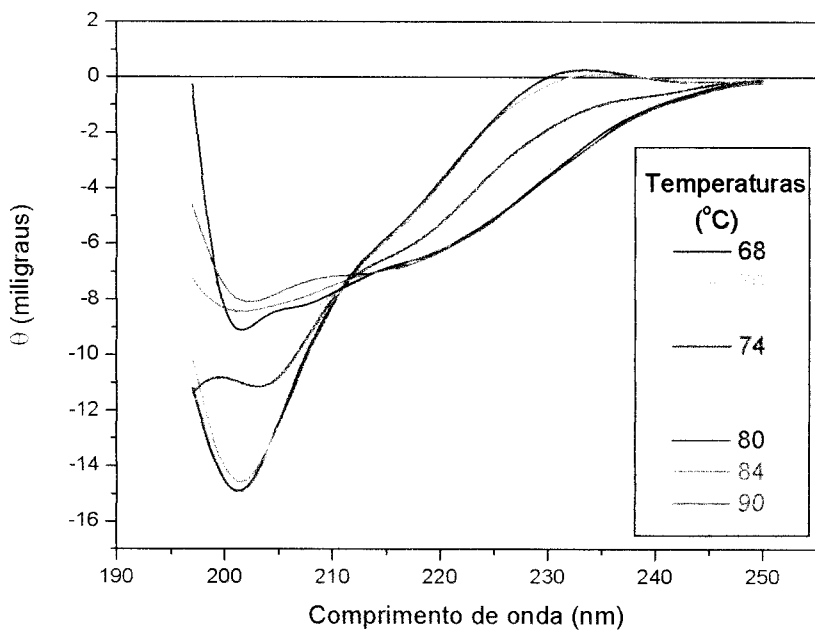
Figura 17. Espectro de emissão de fluorescência do inibidor em diferentes pHs. Foi utilizado uma solução protéica de aproximadamente 0,07mg/mL. A excitação foi realizada com comprimento de onda de 295nm e os espectros de emissão foram monitorados no intervalo de 305 à 450nm.

4.10.2. Análise da estabilidade do inibidor em diferentes temperaturas por CD

As medidas de CD do SbKI realizadas nas temperaturas de 5° a 85°C, mostraram estabilidade estrutural até 70°C (figura 17.a), e acima desta temperatura foi observado alterações estruturais. Assim, as medidas acima de 70°C foram realizadas de 2 em 2 graus até 90°C (figura 17.b). O espectro em 78°C mostra a perda da forma característica do inibidor nativo, deduzindo-se que tenha ocorrido desnaturação completa do mesmo. A temperatura de transição foi calculada em 73,3°C.



17a.



17b.

Figura 18. Espectros de CD do SbKI variando-se a temperatura. As medidas foram realizadas utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico, com uma solução protéica, cuja concentração foi de aproximadamente 0,16mg/mL. Foram realizadas 16 varreduras em cada medida, variando o comprimento de onda de 196 a 250 nm. A figura 17a. mostra os espectros, cujas medidas foram realizadas nas seguintes temperaturas: 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 75°, 80°, 85°C e a figura 17b. mostra os espectros, cujas medidas foram realizadas entre as temperaturas 68° a 90°C, variando-se dois graus em cada medida.

4.11. Conclusões finais

Pela análise do N-terminal das duas cadeias do SbKI deduziu-se um alto grau de identidade seqüencial (maior que 70%) quando comparado com outros inibidores do tipo Kunitz. As análises espectroscópicas do SbKI, formado predominantemente por elementos β e estruturas desordenadas, é compatível com estruturas de inibidores tipo Kunitz descritos na literatura. Estes dados sugerem classificá-lo dentro dessa classe. Isso pode ser devido ao fato de que os inibidores de proteases de origem vegetal tenham tido um ancestral comum e que, ao longo da evolução esses inibidores tenham se divergido formando os vários inibidores encontrados atualmente.

O SbKI foi capaz de inibir as serinoproteases tripsina e calicreína plasmática com K_I de poucos nM. Ressaltamos que esta última enzima esta envolvida em diferentes processos fisiológicos como a coagulação, liberação de diferentes tipos de cininas e também em processos fisiopatológicos como o inflamatório.

O K_I deste inibidor, comparado com outros descritos na literatura, demonstra que ele pode ser considerado um potente inibidor destas duas serinoproteases, tornando-o um alvo que deve ser submetido a estudos estruturais mais detalhados, a fim de se considerar sua possível aplicação nos processos fisiopatológicos em que estas enzimas alvo estiverem envolvidas.

Referências

1. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P.. Molecular biology of the cell . 4ª edition. New York. pp. G:29, 2002.
2. Amour, A.; Bird, M.; Chaudry, L.; Deadman, J.; Hayes, D. and Kay, C. General considerations for proteolytic cascades. Biochem Soc Trans. v.32 (Pt 1), pp.15-6, 2004.
3. Bode, W. and Huber, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. Biochimica et Biophysica Acta. v.1477, pp. 241-52, 2000.
4. Branden, Carl and Tooze, J. Introduction to protein structure. Second edition 1999, pp. 410.
5. Bueno. N.R.; Fritz, H.; Auerswald, E.A.; Mentele, R.; Sampaio, M.; Sampaio, C.A. M. and Oliva, M.L.V. Primary Structure of *Dioclea glabra* Trypsin Inhibitor, DgTI, a Bowman–Birk Inhibitor. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 261, 838–843 1999.
6. Cantor, C.R. and Schimmel, P.R. Biophysical Chemistry, Part II: Tecniques for the study of biological structure and function: spectroscopic analysis of biopolymers. New York, W.H.Freeman and Company, pp. 846, 1980.
7. Carta do Brasil ao Milionésimo. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia) 1972ª. Folha SF-23. /rio de Janeiro. Escala 1:1.000.000 – Primeira Edição.IBGE].

8. Ceciliani, F.; Tava, A.; Iori, R.; Mortarino, M.; Odoardi, M. and Ronchi, S. A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. *Phytochemistry*, v. 44, n°3, pp. 393-8, 1997.
9. Colman RW and Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*. v. 90, n° 10, pp. 3819- 43, 1997.
10. Cooper, J.B. Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. *Current Drug Targets*. v. 3, pp 155-73. 2002
11. DeClerck Y.A.. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *European Journal of Cancer*. v. 36, pp. 1258 – 68, 2000.
12. Eftink, M.R. *Methods of biochemical analysis: fluorescence techniques for studying proteins structure*. Edited by Clarence H. Suelter, John Wiley & Sons. 1991
13. Fasman, G.D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Plenum Press, New York, 1996.
14. Friedman, M., Krull, L.H., Cavins, J.F. The chromatographic determination of cysteine and cysteine residues in proteins as s-beta-(4-pyridylethyl) cysteine, *J.Biol. Chem.* 245 (1970) 3868-71.
15. Garcia, V.A.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S and Macedo, M.L.R. Trypsin Inhibitor from *Poecilanthe parvi.ora* Seeds: Purification, Characterization, and Activity Against Pest Proteases. *The Protein Journal*, v. 23, n°. 5, 2004.

16. González, Y.; Araújo, M. S.; Oliva, M. L. V.; Sampaio, C. A. M. and Chávez, M. A. Purification and preliminary characterization of a plasma kallikrein inhibitor isolated from sea hares *Aplysia dactylomela* Rang, 1828. *Toxicon*. v. 43, n° 2, pp. 219-23, 2004.
17. Grzonka, Z.; Jankowska, E.; Kasprzykowski, F.; Kasprzykowska, R.; Lankiewicz, L.; Wiczak, W.; Wiczerzak, E.; Ciarkowski, J.; Drabik, P.; Janowski, R.; Kozak, M.; Jaskolski, M. and Grubb, A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol.* v.48, n° 1, pp. 1-20 2001.
18. Guyton, A.C. and Hall, J.E. *Tratado de fisiologia médica*. Nona edição, Guanabara Koogan, 1997, pp 1014, 1997.
19. Hansen, D. BbCI, Inibidor de cruzipaina de *Bauhinia bauhinioides*: isolamento do cDNA e expressão heteróloga. São Paulo, 2004. pp. 80. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.
20. Haq, S.K. and Khan, R.H. Characterization of a Proteinase Inhibitor from *Cajanus cajan* (L.). *Journal of Protein Chemistry*, v. 22, n° 6, 2003.
21. Haq, S.K.; Atif, S.M. and Khan, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 431, n° 1, pp. 145-59, 2004
22. Harris, E.L.V. and Angal, S. *Protein purification methods – a practical approach*. Oxford University Press pp317, 1993
23. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* v. 102, pp. 4501-23, 2002.
24. Jovin, I.S. and Müller-Berghaus, G. Interrelationships between the fibrinolytic system and lipoproteins in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. v. 174 n° 2, pp. 225-33, 2004.

25. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. *J.Biol.Chem.*, v.193,, p. 265, 1951.
26. Kelly, S.M. and Price, N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochemica et Biophysica Acta*. v. 1338, pp. 161-85, 1997.
27. Krauchenco, S.; Nagem R A.P.; Silva, J.A.; Marangoni, S. and Polikarpov, I. Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. *Biochimie*. v. 86, pp. 167–72, 2004.
28. Krauchenco, S.; Silva, J.A.; Nagem, R.A.P.; Brandão Neto, J.R.; Forrer, V.P.; Carmona e Ferreira, R.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C.; Marangonib, S. and Polikarpov, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel trypsin inhibitor from seeds of *Copaifera langsdorffii*. *Acta Crystallographica Section D*. v. D57, 1316 - 8, 2001.
29. Krauchenco, S.; Pando, S.C.; Marangoni S. and Polikarpova, I. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 312, pp. 1303–8, 2003.
30. Koiwa, H.; Bressan R.A. and Hasegawa, P.M.. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in plant science*. v 2 n°10, pp. 379-84, 1997.
31. Mello, G.C.; Oliva, M.L.V.; Sumikawa, J.T.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C. and Macedo, M.L.R. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *Journal of Protein Chemistry*, v 20, n°8, 2002.
32. Molinari, F.; Meskanaite, V.; Munnich, A.; Sonderegger, P. and Colleaux, L. Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system. *Human Molecular Genetics*. v. 12, n° 2, 2003.

33. Negreiros, A.N.; Carvalho, M.M.; Xavier Filho, J.; Blanco-Labra, A.; Shewry, P.R. and Richardson, M. The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry*. v.30, n° 9, pp. 2829-33, 1991.
34. Nelson, D.L., Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3ª edição, pp 1152, USA, 2000.
35. Odani, S.; Odani, S.; Ono, T. and Ikenaka, T. Proteinase inhibitors from a mimosoideae legume, *Albizzia julibrissin*. Homologues of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *J. Biochem.* v. 86, n° 6, 1795-1805, 1979.
36. Oliva, M.L.V.; Souza-Pinto, J.C.; Batista, I.F.C.; Araújo, M.S.; Silveira, V.F.; Auerswald, E.A.; Mentele, R.; Eckerskorn, C.; Sampaio, M.U. and Sampaio, C.A.M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1477, pp. 64-74, 2000.
37. Oliva, M.L.; Mendes, C.R.; Santomauro-Vaz, E.M.; Juliano, M.A.; Mentele, R.; Auerswald, E.A.; Sampaio, M.U., Sampaio, C.A. *Bauhinia bauhinioides* plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. *Curr Med Chem*. v. 8, n° 8, pp. 977-84, 2001.
38. Onesti, S.; Brick, P. and Blow, D.M. Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. *J. Mol. Biol.* Jan 5;217(1), pp. 153-76. 1991.
39. Otlewski, J.; Jaskolski, M.; Buczek, O.; Cierpicki, T.; Czapinska, H.; Krowarsch, D.; Smalas, A.O.; Stachowiak, D.; Szpineta, A. and Dadlez, M. Structure-function relationship of serine protease-protein inhibitor interaction. *Acta Biochimica Polonica*. v 48, n° 2, pp. 419-28, 2001.

40. Pandoa, S.C.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Di Cieroa, L.; Novello, J.C. and Marangonia, S. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*. v. 57, pp. 625–31, 2001.
41. Pesquero, J.B. and Bader, M. Molecular biology of the kallikrein–kinin system: from structure to function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 31, pp. 1197–203, 1998
42. Powers, J.C.; Asgian, J.L.; Ekici, Ö.C. and James, K.E.. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. *Chemical Reviews*, v. 102, 4639-750, 2002.
43. Quinsey, N.S.; Greedy, A.L.; Bottomley, S.P.; Whisstock, J.C. and Pike, R.N. Antithrombin: in control of coagulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v. 36, pp. 386–89, 2004.
44. Rao, N.V.; Wehner, N.G.; Marshall, B.C.; Gray, W.R.; Gray, B.H. and Hoidal, J.R. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. *J. Biol Chem*. v. 266, pp. 9540-8, 1991.
45. Richardson, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in plant Biochemistry*. v.5, pp 259-305, 1991.
46. Richardson,M.; Campos,F.A.P.; Xavier-Filho,J.; Macedo,M.L.R.; Maia,G.M.C. and Yarwood,A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin iso-inhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian Carolina tree (*Adenanthera pavonina* L.). *Journal Biochim. Biophys. Acta*. v. 872, pp. 134-40, 1986.
47. Schägger, H and von Jagow, G. Tricine Sodim Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in range form 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. v. 166, pp. 368-79, 1987.

48. Scopes, R.K. Protein purification – Principles and practice. 3ª edição, pp. 380, 1994
49. Silva, J.A.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C. and Marangoni, S. Biochemical Characterization and N-Terminal Sequences of Two New Trypsin Inhibitors from *Copaifera langsdorffii* Seeds. Journal of Protein Chemistry. v. 20, nº 1, 2001.
50. Simões, I. and Faro, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. Eur. J. Biochem. v. 271, pp. 2067 – 75, 2004.
51. Soares-Costa, A.; Beltrami, L.M.; Thiemann, O.H. and Henrique-Silva, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification and antifungal activity. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 296, pp. 1194–1199, 2002.
52. Sreerama, N. and Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. Anal Biochem. v. 287, pp 252-60, 2000.
53. Stryer, L. Bioquímica. 4ª edição, Guanabara Koogan, pp1000, 1996.
54. Valueva T.A.; Revina, T.A.; Mosolov, V.V. and Mentele R. Primary structure of potato kunitz-type serine proteinase inhibitor. Biol Chem. v. 381, nº 12, pp. 1215-21, 2000.
55. Vieira, D.F. Isolamento e caracterizacao do cDNA, producao heterologa e analise estrutural de BbKI: um inibidor de proteinase de Bauhinia bauhinioides. São Carlos, 2004. pp. 81. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
56. Voet, D. and Voet, J. Biochemistry. Second edition, pp 1361, 1995.
57. Wlodawer, A.; Deisenhofer, J. and Huber, R. Comparison of two highly refined structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor, J. Mol. Biol. v.193, pp.145–56, 1987.

58. Wu,H.C. and Lin,J.Y. The complete amino acid sequence of a Kunitz family trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confuse*. J. Biochem. v. 113, n° 2, pp. 258-63, 1993.
59. Yousef, G.M. and Diamandis, E.P. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: Emerging candidate tumour markers. Clinical Biochemistry. v. 36, pp. 443-52, 2003.
60. <http://www.geocities.com/Athens/Sparta/9758/hemato/hemato.htm>.
61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
62. <http://clustalw.genome.jp>