PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA APROTININA OBTIDA DE PULMÃO SUÍNO

SANDRA DE CÁSSIA DIAS

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2008

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA APROTININA DE PULMÃO SUÍNO

SANDRA DE CÁSSIA DIAS

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Flávia Saldanha Kubrusly

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Dias, Sandra de Cássia.

Purificação e caracterização da aprotinina obtida de pulmão suíno /
Sandra de Cássia Dias. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Flávia Saldanha Kubrusly.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Pulmão suíno como fonte de
inibidores de serinoproteinases.

Versão do título para o inglês: Purification and characterization of the
aprotinin from porcine lung.

Descritores: 1. Inibidores de enzimas 2. Proteinases 3. Proteínas
4. Suínos 5. Circulação extracorpórea I. Kubrusly, Flávia Saldanha
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. III.
Título.

ICB/SBIB199/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Sandra de Cássia Dias.

Título da Tese: Purificação e caracterização da aprotinina obtida de pulmão suíno .

Orientador(a): Flávia Saldanha Kubrusly.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a) ☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 354/06, sobre o projeto intitulado "Isolamento e purificação de um inibidor de protease de origem suína", sob a responsabilidade de Flávia Saldanha Kubrusly está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/02/2007.

São Paulo, 13 de fevereiro de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

À minha amada mãe, Efigênia, e ao meu, inesquecível pai, Moacir, pela dedicação, empenho e sabedoria em educar-me.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amor incondicional, sustento diante dos desafios e por suprimir todas as minhas necessidades.

À Dra Flávia S. Kubrusly pela dedicação, disponibilidade e confiança em orientar-me. Mas principalmente pela amizade e cuidado durante estes anos.

A minha mãe, Efigênia, minhas irmãs, Sônia e Noeme, meus irmãos, Sílvia e Etienne, pelo apoio sempre presente e pelo imenso amor que nos une.

As minhas pequenas sobrinhas, Sílvia, Sarah e Sophia pelas brincadeiras, carinho, alegria e ternura intrínseco das crianças.

Ao Professor Isaías Raw pelo apoio, exemplo e dedicação à ciência.

A todos os funcionários e funcionárias do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

Ao Dmitri Iourtov pela paciência e boa vontade em ensinar-me a utilizar os equipamentos.

À Dra. Patrícia Antônia Estima Abreu do Laboratório de Biotecnologia Molecular II, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, pela valiosa colaboração nos experimentos de Biologia Molecular.

À Dra. Isabel de Fátima Correia Batista do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, do Instituto Butantan, e a Dra. Aparecida Sadae Tanaka do Laboratório de Bioquímica e Biofísica da Universidade Federal de São Paulo pela valiosa colaboração no sequenciamento do N-terminal dos inibidores.

A todos os amigos e amigas do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan pelo auxílio e convivência. A Lucila, Dirce, Ana Paula Gonçalves, Ana Paula Aranha e Paulo pela inestimável amizade e auxílio.

As amigas; Ana Fabíola, Jaíla e Kátia e Priscila pelo apoio e amizade que tornaram este tempo mais belo e alegre.

À Fundação Butantan, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

A Sada pelos pulmões suínos.

A todas as pessoas que contribuíram nesta e também, nas etapas anteriores da minha formação.

“Vi ainda debaixo do sol que não é dos ligeiros o prêmio, nem dos valentes, a vitória, nem tampouco dos sábios, o pão, nem ainda dos prudentes, a riqueza, nem dos inteligentes, o favor; porém tudo depende do tempo e do acaso.”

Eclesiastes 9.11

RESUMO

DIAS, S, C. **Purificação e caracterização da aprotinina de pulmão suíno**. 2008. 128 f. Tese de Doutorado (Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A aprotinina, um inibidor de serinoproteinase ácido resistente de massa molar de 7 kDa, é utilizada como insumo ou medicamento. O objetivo principal deste trabalho foi purificar a aprotinina a partir de pulmão suíno. O extrato pulmonar suíno obtido foi denominado de sobrenadante da precipitação ácida. Três procedimentos cromatográficos foram utilizados para purificar a aprotinina a partir de pulmão suíno. O primeiro procedimento utilizou a cromatografia de afinidade (tripsina-agarose). O segundo procedimento utilizou a filtração tangencial com membranas de 10 kDa. O filtrado de 10 kDa foi aplicado na coluna de afinidade (tripsina-Sepharose). O terceiro procedimento utilizou três cromatografias: filtração em gel, troca-iônica (colunas SP e Q-Sepharose conectadas em série) e afinidade (tripsina-agarose). A aprotinina foi purificada de pulmão suíno utilizando o terceiro procedimento. As frações ativas eluídas, com HCl 10 mM, da coluna tripsina-agarose carregada com as frações eluídas da SP e Q-Sepharose apresentaram bandas de 7 kDa e migração eletroforética semelhante a aprotinina bovina. Esta banda foi reconhecida pelo anticorpo policlonal anti aprotinina bovina. Este achado foi reforçado pela obtenção da sequência parcial do gene da aprotinina suína, depositado no “Gene Bank” (EU392176), que apresentou 74% de identidade com a sequência de nucleotídeos da aprotinina bovina. Em suma, a aprotinina foi purificada a partir de pulmão suíno. O protocolo de purificação utilizado permitiu recuperar 85 µg de aprotinina por kg de pulmão suíno. Além disso, outros dois inibidores de serinoproteases foram purificados: o fragmento ativo do segundo domínio do inibidor endógeno da leucoprotease secretada (SLPI), e um segundo inibidor de alta massa molecular, provavelmente bikunina.

Palavras-chave: aprotinina; inibidores do tipo Kunitz; inibidores de proteases; purificação de proteína.

ABSTRACT

DIAS, S, C. **Purification and characterization of the aprotinin from porcine lung**. 2008. 128 f. Doctor thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Aprotinin, an acid stable serine proteinase inhibitor with a molecular mass of 7 kDa, is used as a reagent or as a drug. In this work, the main goal was the purification of the aprotinin from porcine lung. The obtained porcine lung extract was named acid precipitation supernatant. Three chromatographic procedures were used for porcine aprotinin purification. The first one used the affinity chromatography. In the second procedure the acid precipitation supernatant was submitted to a tangential ultra flow filtration with 10 kDa membrane. The 10 kDa filtrate was then also applied to a trypsin-Sepharose column. Porcine lung aprotinin was purified by the third procedure. This last procedure employed gel filtration, ion-exchange (SP-Sepharose and Q-Sepharose) and affinity chromatography (trypsin-agarose). The active fractions eluted with 0.35 M NaCl from the trypsin-agarose column, which was loaded with the active fractions of the Q and SP-Sepharose, showed bands which had the same molecular mass and electrophoretic profile of the bovine aprotinin. The bands were recognized by the commercial polyclonal serum anti-bovine aprotinin. This finding was reinforced by the obtained partial sequence of the aprotinin gene. This sequence was deposited in the “Gene bank” (EU392176). The porcine aprotinin nucleotide sequence showed 74 % identities and 86 % similarities with the bovine aprotinin sequence. This work presented first time the purification of aprotinin from porcine lung. The yield of the porcine aprotinin purification was 85 µg / kg of the porcine lung. Another two serine proteinase inhibitors were purified from porcine lung: the active fragment of the secretory leukoprotease inhibitor second domain and one high molecular mass inhibitor, probably bikunin.

Key-words: aprotinin; Kunitz type inhibitors; protease inhibitors and protein purification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.2.1.1.1 – Seqüência de aminoácidos da aprotinina bovina e posição das pontes dissulfeto (Cys-Cys).....	25
Figura 1.2.1.1.2 – Estrutura da aprotinina segundo Huber et al e Deisenhofer and Steigemann apud Fritz and Wunderer, 1983.....	26
Figura 1.2.1.2.1 – Esquema do inibidor de tripsina inter- α e do inibidor pré- α	31
Figura 1.2.1.2.2 – Esquema da estrutura da Bikunina.....	32
Figura 1.2.3.1 – Esquema da estrutura de SLPI.....	41
Figura 1.2.3.2 – Seqüência da estrutura primária da pré-elafina e elafina.....	43
Figura 4.1.1 – Fluxograma de extração do inibidor ácido resistente a partir de pulmão suíno....	62
Figura 4.1.2 – Caracterização dos sobrenadantes da precipitação ácida (SPA 1 e SPA 2) - A, B e C - SDS-PAGE 15%. D - Zimografia Reversa	64
Figura 4.2.1.1 – Fluxograma da purificação do inibidor suíno ácido resistente a partir do SPA 2.....	66
Figura 4.2.1.2 – SDS-PAGE 15%. Análise eletroforética das frações eluídas da cromatografia de afinidade (tripsina-agarose) a partir do SPA 2.	68
Figura 4.2.2.1 – SDS-PAGE 15%. Análise eletroforética do concentrado e filtrado de 10 kDa..	70
Figura 4.2.2.2 – Fluxograma da purificação do inibidor ácido resistente a partir do filtrado de 10 kDa.....	71
Figura 4.2.2.3 – Caracterização das frações eluídas da cromatografia tripsina-Sepharose a partir do filtrado de 10 kDa.....	74
Figura 4.2.3.1 – Fluxograma da purificação da aprotinina suína a partir do SPA 2 utilizando as cromatografias de filtração em gel, troca-iônica e afinidade.....	76
Figura 4.2.3.2 – SDS-PAGE 15%. Análise eletroforética das frações eluídas da Q-Sepharose e SP-Sepharose.....	80
Figura 4.2.3.3 – Caracterização da aprotinina purificada a partir de pulmão suíno.....	85
Figura 4.2.4.1 – Seqüência de nucleotídeos da aprotinina suína.....	87
Figura 4.2.4.2 – Alinhamento da seqüência de aminoácidos da aprotinina bovina e da seqüência	

predita de aminoácidos da aprotinina suína.....	88
Figura 4.3.1 – Caracterização imunoenzimática (“western blot”) do “pool” das frações 3 e 4 eluídas da tripsina-agarose.....	91
Figura 4.3.2 – Caracterização imunoenzimática (“western blot”) da fração 0,5 M de NaCl eluída da heparina-Sepharose.....	92
Figura 4.3.3 – Fluxograma da purificação de SLPI a partir do SPA 2.....	93
Figura 4.3.4 – SDS-PAGE 15%. Análise eletroforética das frações eluídas da cromatografia de afinidade (tripsina-Sepharose). As amostras, concentrado de 3 kDa (369 mg) e concentrado de 100 kDa (187 mg), foram aplicadas, separadamente na coluna tripsina-Sepharose (8,0 mL).....	97
Figura 4.3.5 – Perfil de eluição (A), concentração de proteína e inibição de tripsina (B) dos picos eluídos da cromatografia de fase reversa C-18.....	98
Figura 4.3.6 – Caracterização eletroforética e imunoenzimática dos picos eluídos da cromatografia de fase reversa.....	99
Figura 4.3.7 – Sequência de aminoácidos do 2º domínio de SLPI (WAP II) de três diferentes espécies de mamíferos.....	100
Figura 4.4.1 – Fluxograma da purificação do inibidor de alta massa molecular a partir do SPA 1.....	103
Figura 4.4.2 – Caracterização das frações eluídas da tripsina-agarose carregada com o SPA 1.....	105

LISTA DE TABELA

Tabela 1.2.1 – Principais famílias de inibidores de serinoproteinases.....	22
Tabela 1.2.2.1 – Classificação das serpinas em Clados.....	37
Tabela 1.2.2.2 – Formas comerciais disponíveis de α_1 -AT.....	39
Tabela 4.1.1 – Concentração de proteína e inibição de tripsina do SPA 1 e do SPA 2.....	63
Tabela 4.2.1.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da tripsina-agarose carregada com o SPA 2.....	67
Tabela 4.2.2.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina do concentrado e do filtrado de 10 kDa.....	69
Tabela 4.2.2.2 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da tripsina-Sepharose carregada com o filtrado de 10 kDa.....	72
Tabela 4.2.2.3 – Rendimento estimativo da purificação do inibidor ácido resistente.....	72
Tabela 4.2.3.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina durante a troca de tampão do SPA 2.....	77
Tabela 4.2.3.2 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da cromatografia de troca-iônica (SP-Sepharose e Q-Sepharose, conectadas em série).....	78
Tabela 4.2.3.3 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M	81
Tabela 4.2.3.4 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M.....	82
Tabela 4.2.3.5 – Rendimento estimativo da purificação aprotinina suína.....	84
Tabela 4.2.4.1 – Composição de aminoácidos da aprotinina bovina e da aprotinina suína (predita).....	89
Tabela 4.2.4.2 – Propriedades físico-químicas da aprotinina bovina e da aprotinina suína.....	89
Tabela 4.3.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina do concentrado de 100 e 3 kDa.....	93

Tabela 4.3.2 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina durante o processo de purificação de SLPI a partir do concentrado de 3 kDa.....95

Tabela 4.3.3 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina durante o processo de purificação de SLPI a partir do concentrado de 100 kDa.....96

Tabela 4.4.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina durante o processo de purificação do inibidor de alta massa molecular a partir do SPA 1.....110

LISTA DE ABREVIATURA

BApNa – Benzoil arginina p-nitroanilina

BCA – ácido bicinconínico

HNE – elastase de neutrófilo humano

NE – elastase de neutrófilo

PBS – salina tamponada com fosfato

pb – pares de base

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Soybean – inibidor de tripsina purificado de soja

SPA – sobrenadante de precipitação ácida

SPA-1 – sobrenadante obtido da precipitação ácida com 1,25% TCA

SPA-2 – sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA

VC – volume da coluna em mL

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Proteases.....	18
1.2 Inibidores protéicos de proteases.....	21
1.2.1 Família Kunitz.....	23
1.2.1.1 Aprotinina.....	23
1.2.1.2 Família dos inibidores de tripsina inter-α (IαI).....	29
1.2.3 Superfamília das Serpinas.....	36
1.2.3 Família dos Antileucoproteinasas: SLPI e elafina.....	40
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	45
2.1 objetivo geral.....	45
2.2 objetivos específicos.....	45
2.3 Justificativa.....	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Materiais.....	47
3.2 Métodos	48
3.2.1 Métodos analíticos.....	48
3.2.1.1 Determinação da inibição de tripsina.....	48
3.2.1.2 Determinação da concentração de proteína total.....	49
3.2.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	49
3.2.1.4 Zimografia reversa.....	50
3.2.1.5 Imunoensaio do tipo “Western Blot”	50

3.2.1.6 Imunoensaio do tipo Elisa – método indireto.....	51
3.3 Métodos de biologia molecular.....	52
3.3.1 Extração de DNA.....	52
3.3.2 Amplificação dos fragmentos gênicos por PCR “Polymerase Chain Reaction”.....	53
3.3.3 Identificação e purificação dos produtos de PCR.....	53
3.3.4 Clonagem.....	54
3.3.5 Sequenciamento do DNA.....	55
3.3.6 Análise das seqüências.....	55
3.4 Extração e isolamento do inibidor ácido estável de pulmão suíno.....	56
3.5 Ultrafiltração tangencial.....	56
3.6 Cromatografia.....	57
3.6.1 Cromatografia de afinidade tripsina-agarose (1ª condição cromatográfica).....	57
3.6.2 Cromatografia de afinidade tripsina-Sepharose (2ª condição cromatográfica).....	57
3.6.3 Associação de cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade (3ª Condição cromatográfica).....	58
3.6.4 Cromatografia de afinidade Heparina-Sepharose (4ª Condição cromatográfica).....	59
3.7 Sequenciamento do N-terminal.....	59
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	61
4.1 Extração de inibidores protéicos de serinoproteases de pulmão suíno tipo aprotinina...61	
4.2 Purificação da aprotinina suína.....	66
4.2.1 Cromatografia de afinidade utilizando o SPA 2.....	66
4.2.2 Cromatografia de afinidade (tripsina-Sepharose) do filtrado de 10 kDa.....	69
4.2.3 Cromatografia de filtração em gel, troca-iônica e afinidade.....	75

4.2.4 - Seqüência de nucleotídeos da aprotinina obtida a partir de pulmão suíno.....	86
4.3 Purificação do inibidor de 16 kDa membro da família dos Antileucoproteinases.....	90
4.4 Purificação de inibidor de alta massa molecular a partir do SPA.....	103
5 CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS.....	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteases

Enzimas proteolíticas, ou proteases, são essenciais para a vida dos organismos vivos correspondendo a 2 a 5 % de todas as proteínas expressas (BARRET et al., 2001). Existem cerca de 500 genes humanos que codificam proteases e seus homólogos. As enzimas proteolíticas são importantes na indústria alimentícia, na biotecnologia e na medicina (POLGAR, 2005).

As proteases participam de muitas funções fisiológicas importantes como: digestão intra e extracelular de proteínas, processamento de proteínas recém-sintetizadas, liberação de peptídeos ativos, diferenciação, apoptose e morte celular, invasão viral, montagem de vírus, infestação parasitária, penetração das camadas internas do óvulo pelo espermatozóide, resposta imune, inflamação, coagulação sangüínea, fibrinólise, controle da pressão sangüínea, oncogênese e outros processos morfogênicos (DASH et al., 2003).

As proteases podem ser divididas em exo e endopeptidases de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia polipeptídica. As exopeptidases atuam nos finais das cadeias polipeptídicas, nas regiões N ou C terminal. Já as endopeptidases ou proteinases são enzimas que clivam ligações peptídicas entre as regiões N-terminal e C-terminal da cadeia polipeptídica (BOND e BUTLER, 1987).

As proteases são classificadas de acordo com seus mecanismos catalíticos (BOND e BUTLER, 1987). Entretanto recentemente, foi sugerida uma nova classificação por famílias baseada na similaridade de aminoácidos das proteases (RAWLINGS et al., 2006). As proteases são classificadas em serinoproteases, cisteínoproteases, aspárticoproteases, metaloproteases, treoninaproteases e glutâmicoproteases.

As serinoproteases têm sítios catalíticos similares caracterizados pela presença do resíduo serina na posição 195. Esta classe é dividida em 22 famílias. Dentre estas famílias, a família mais estudada e melhor caracterizada é a família da quimotripsina. A maioria das enzimas desta família são endopeptidases (proteinases); tripsina, quimotripsina, elastase, catepsina G, enzimas da hemostasia e da coagulação são alguns destes exemplos (RAWLINGS et al., 2006).

As cisteínoproteases são encontradas em quase todos os organismos vivos; protozoários, bactérias, fungos, leveduras, vegetais e mamíferos. As cisteínoproteases estão envolvidas em vários processos fisiológicos como a digestão de proteínas nos lisossomos, apresentação de antígeno, processamento proteolítico, proliferação celular e apoptose (RZYCHON et al., 2004). O sítio ativo das cisteínoproteases é formado pelo grupo sulfidril do resíduo Cys-25 e pelo grupo imidazol do resíduo His-159. As cisteínoproteases podem ser agrupadas em duas superfamílias; a superfamília da enzima conversora de interleucina 1 β , e a superfamília da papaína. A superfamília da papaína é formada pelas famílias da papaína, da calpaína e da bleomicina. A família da papaína é a mais estudada e caracterizada. Alguns dos seus membros são; papaína purificada de *Cariaca papaya*, e as catepsinas B, H, L e S purificadas de células de mamíferos (CHAPMAN et al., 1997).

As aspárticoproteases têm sido isoladas e estudadas de vários organismos; vertebrados, plantas, fungos, parasitas, retrovírus, e bactérias. Elas são caracterizadas pela presença de 2 resíduos aspárticos no sítio ativo e pela dependência de um meio de reação fortemente ácido. A família mais conhecida é a família da pepsina, encontrada nos eucariontes. As enzimas pepsina e quimosina, a enzima lisossômica catepsina D, renina e peptidase aspártica de levedura são exemplos desta família. Outra família das aspárticoproteases são as retropepsinas, como a protease do vírus HIV (DASH et al., 2003).

As metaloproteases são endopeptidases dependentes de um átomo de metal, quase sempre Zn⁺², para realizarem suas funções. O átomo de metal é ligado por dois resíduos de histidina e um resíduo de ácido glutâmico. Exemplos clássicos de metaloproteínas incluem a enzima conversora de angiotensina, as carboxipeptidases e as enzimas da matriz de metaloproteínas (colagenases, gelatinases e estromelisinases). Outra família das metaloproteínas é representada pelas metaloproteínas tipo membrana (MT-MMPs) que contém um domínio extracelular e um domínio transmembrânico (VERMA e HANSCH, 2007).

Quando a estrutura cristalográfica do proteasoma de *Saccharomyces cerevisiae* foi determinada mostrando um resíduo de treonina N-terminal no sítio ativo foi descoberto o quinto mecanismo catalítico, surgindo a família das treoninaproteases (LOWE et al., 1995). Proteasoma é um complexo proteolítico dependente de ATP encontrado no citossol e no núcleo de células eucarióticas, sendo a principal via para degradação de proteínas marcadas pela ligação com a

ubiquitina (BAUMEISTER e LUPAS, 1997; KISSELEV et al., 2000). A enzima precursora de glicosilasparaginase, a enzima gama-glutamyltransferase 1 e o precursor de ornitina acetiltransferase bacteriana pertencem à classe das treoninaproteases.

Glutâmicoproteases é a classe de proteases formada apenas pela família G1 de proteinases de fungos filamentosos (RAWLINGS et al., 2006). O sítio ativo desta proteinase é formado por um resíduo de ácido glutâmico (Glu-136) e um resíduo de glutamina (Gln-53). Estas proteases são produzidas pelos fungos filamentosos durante a infecção de plantas. Esta família pertencia à classe das aspárticoproteinases, mas apesar da sua atividade ótima em pH ácido, ela não apresentava similaridades com a sequência das aspárticoproteases. Algumas glutâmicoproteases são responsáveis por degradar proteínas recombinantes produzidas em *Aspergillus niger* (PILLAI et al., 2007).

Como já mencionado as proteases são vitais para os seres vivos participando de vários processos fisiológicos. Elas devem ser mantidas sob controle estrito a fim de garantir a homeostase do organismo. O nível basal de controle é normalmente alcançado pela expressão/secreção, pela ativação de pró-protease e pela degradação de enzimas maduras. O segundo nível de regulação, após a sua ativação, ocorre pela inibição de sua atividade proteolítica por proteínas naturais existentes dentro ou fora da célula que são chamadas de inibidores de proteases (HOLZER e HEINRICH, 1980; KHAN e JAMES, 1998).

1.2 Inibidores protéicos de proteases

Os inibidores protéicos de proteases são encontrados em quase todos os tecidos de animais, plantas e microrganismos e são objetos de muitos estudos direcionados para suas aplicações na medicina, agricultura e biotecnologia. Na medicina, estes inibidores são administrados para tratar doenças causadas por atividade proteolítica excessiva, como enfisema pulmonar, angioedema hereditário e distúrbios da hemostasia. Na agricultura, os inibidores são utilizados contra as enzimas digestivas dos microrganismos causadores de doenças. Plantas transgênicas expressando os inibidores são mais resistentes a estes microrganismos e, portanto mais produtivas. Na biotecnologia os inibidores de proteinases são utilizados como insumo para inibir a proteólise indesejada durante a purificação de proteínas naturais ou recombinantes, e também durante o cultivo celular.

Os inibidores podem ser classificados de acordo com a classe de protease inibida em: inibidores de aspárticoproteases, cisteínoproteases, metaloproteases, serinoproteases, treoninaproteases e de glutâmicoproteases (inibidores protéicos destas duas últimas classes ainda não foram descritos) (LASKOWSKI e KATO, 1980; LASKOWSKI, 1986; LASKOWSKI et al., 1987; OTLEWSKI et al., 2005). A principal crítica a esta classificação é a existência de inibidores de mais de uma classe de proteases. Rawling et al. (2004) propuseram uma nova classificação que solucionasse esta dificuldade. Para tanto, os inibidores de proteinases seriam agrupados em famílias numeradas de acordo com a similaridade detectada na sequência de aminoácidos. Neste trabalho a classificação utilizada ainda é a descrita por Laskowski e Kato (1980).

Das quatro classes de inibidores de proteinases a classe dos inibidores de serinoproteinases é a mais estudada e melhor caracterizada. Há pelo menos 20 famílias de inibidores de serinoproteinases conhecidas. As principais famílias destes inibidores estão listadas na tabela 1.2.1.

Tabela 1.2.1 – Principais famílias de inibidores de serinoproteinases.

Animal
Família Kunitz
Família Kazal
Família do inibidor de <i>Ascaris</i>
Família Antileucoproteinase / Queloniana
Família das serpinas
Família Hirudina
Vegetal
Família Kunitz
Família Bowman-Birk
Família batata 1
Família batata 2
Família do inibidor de tripsina de centeio
Família centeio
Microrganismo
Família do inibidor de subtilisina

FONTE: Laskowski e Kato, 1980.

1.2.1 Família Kunitz

Os inibidores do tipo Kunitz estão presentes em vertebrados e invertebrados, incluindo humanos, bovinos, ovinos, suínos, caramujos e serpentes (PETERSEN et al., 1996; FRITZ e WUNDERER, 1983; FIORETTI et al., 1990; STALLINGS-MANN et al., 1994; DIETL e TSCHESCHE, 1975). Essa ubiquidade sugere o papel fundamental dessa família de inibidores nos animais. Os membros da família Kunitz compartilham um alto grau de similaridade seqüencial e estrutural. Normalmente o domínio tipo Kunitz é formado por uma cadeia de 60 resíduos de aminoácidos, estabilizada por três pontes dissulfeto (GREIGHTON e CHARLES, 1987B). Apesar da grande similaridade dos membros da família Kunitz, eles são bem específicos. Muitos membros desta família presentes nos venenos de serpentes não são tóxicos atuando primariamente como inibidores de serinoproteinases, enquanto outros são neurotoxinas potentes e altamente específicas (ZUPUNSKI et al., 2003). Dentre os membros da família Kunitz a aprotinina é o inibidor mais estudado e o primeiro obtido na forma cristalizada (FRITZ e WUNDERER, 1983).

1.2.1.1 Aprotinina

A aprotinina também é conhecida como; inibidor de tripsina de pâncreas bovino ou inibidor básico pancreático de tripsina (BPTI), inibidor de tripsina e calicreína (TKI) ou ainda Trasylol® (nome da aprotinina comercializada pela Bayer). É um inibidor de proteinase não seletivo e foi isolado independentemente por Kraut et al. (1930) como um inativador de calicreína a partir de nódulos linfáticos bovinos, e também na forma cristalizada por Kunitz e Northrop em 1936 a partir de pâncreas bovino (FRITZ e WUNDERER, 1983).

A aprotinina é encontrada em pequenas concentrações em vários órgãos bovinos: pulmão, glândula parótida, baço, fígado, pâncreas e vesículas seminais (FRITZ e WUNDERER, 1983; ELEUTERI et al., 1994; FIORETTI et al., 1989). A concentração deste inibidor no pulmão bovino é de aproximadamente 0,02 % do seu peso úmido, apresentando níveis menores nos

outros órgãos bovinos (GREIGHTON e CHARLES, 1987a). O pulmão bovino é utilizado para extração e purificação da aprotinina para propósitos comerciais, o pâncreas e glândulas parótidas de bovinos também podem ser utilizados para este propósito (FRITZ e WUNDERER, 1983). Este inibidor era considerado restrito aos ruminantes (LASKOWSKI e KATO, 1980). Na forma recombinante, a aprotinina é produzida a partir da expressão em *Nicotiana tabacco* (tabaco) e disponível comercialmente como insumo (Merck Index, 1996).

A aprotinina é um polipeptídio de 6,5 kDa formado por 58 resíduos de aminoácidos arranjados em uma única cadeia (KASSELL, 1970). Esta cadeia tem seis resíduos de cisteína que formam três pontes dissulfeto (Cys-5–Cys-55, Cys-14–Cys-38 e Cys-30–Cys-51) (Figura 1.2.1.1.1). Sua estrutura piriforme apresenta os radicais hidrofóbicos localizados no interior da molécula, enquanto os radicais hidrofílicos, com exceção do resíduo Asp-43, estão localizados para o exterior que está exposto ao meio aquoso (Figura 1.2.1.1.2). Este arranjo e as três pontes dissulfeto colaboram para a estrutura terciária muito compacta da aprotinina e ajudam na notável estabilidade deste inibidor contra desnaturação por altas temperaturas, ácidos, álcalis, solventes orgânicos e degradação proteolítica (FRITZ e WUNDERER, 1983). O ponto isoelétrico da aprotinina bovina é ao redor de 10.5.

O sítio reativo da aprotinina é formado pelo resíduo Lys-15 na posição P1 e pelo resíduo Ala-16 na posição P1'. Porém, outros resíduos, particularmente aqueles presentes na região do “loop” inibitório contribuem para a ligação do inibidor à proteinase (Figura 1.2.1.1.2). A aprotinina inibe as proteases; tripsina, anidrotripsina, tripsinogênio e quimotripsinogênio bovino, plasmina humana e plasmina suína, calicreínas suínas (pancreática, submandibular, urinária e plasmática), calicreínas humanas (plasmática e urinária), uroquinase humana, elastase de neutrófilo humano (HNE) e catepsina G (FRITZ e WUNDERER, 1983).

Figura 1.2.1.1.1 – Sequência de aminoácidos da aprotinina bovina e posição das pontes dissulfeto (Cys-Cys). O sítio reativo, Lys-15, está marcado com um asterisco.

FONTE: informativo do produto aprotinina de pulmão bovino comercializado pela Sigma-Aldrich.

Figura 1.2.1.1.2 – Estrutura da aprotinina. Os resíduos de aminoácidos na área rachurada estão em contato com a enzima no complexo inibidor-enzima.

FONTE: Huber et al.¹; Deisenhofer e Steigemann² *apud* Fritz e Wunderer, 1983.

Anderson e Kingston (1983) isolaram do genoma bovino a sequência de 677 pares de bases contendo a sequência gênica que codifica a aprotinina bovina madura. Três anos depois estes autores (KINGSTON e ANDERSON, 1986) apresentaram a sequência de nucleotídeos de aproximadamente 4000 pares de bases (4 kb) do gene da aprotinina. Um ano depois, Creighton e Charles (1987a) a partir dos RNAs extraídos de pulmão e de fígado bovino descreveram que o gene da aprotinina bovina é formado por 3 éxons e 2 íntrons. O éxon do meio codifica para a proteína madura, enquanto os outros dois éxons codificam as extensões amino-terminal de 33 ou 35 resíduos, e carboxi-terminal de 7 resíduos de aminoácidos. Dessa forma, o precursor da

¹HUBER, R.; KUKLA, D.; RÜHLMANN, A.; STEIGMANN, W.; In: FRITZ, H.; TSCHESCHE, H. (Ed.). **Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors**. W de Gruyter, Berlin, 1971. p. 56– 64.

²DEISENHOFER, J.; STEIGEMANN, W.; In: FRITZ, H.; TSCHESCHE, H.; GREENE, L. J.; TRUSCHEIT, E. (Ed) **Proteinase inhibitors – Bayer Symposium V**. Springer Verlag, Berlin, 1974. p. 484– 496.

molécula de aprotinina apresenta 98 ou 100 resíduos de aminoácidos que após processamento proteolítico não específico das extensões amino e carboxi-terminais originam uma proteína madura de 58 aminoácidos (GREIGHTON e CHARLES, 1987a). Esta forma precursora da aprotinina representa um polipeptídeo com comprimento mínimo necessário para inserir a cadeia nascente através da membrana, ou estar envolvida no “folding” ou ainda no direcionamento celular desta proteína (GREIGHTON e CHARLES, 1987a). A aprotinina madura foi detectada por técnicas imunohistoquímicas em mastócitos isolados do parênquima e do tecido conectivo pulmonar (FRITZ e KRUCK, 1979; BUSINARO et al., 1988; FIORUCCI et al., 1995). A aprotinina é uma proteína intracelular, armazenada dentro de organelas celulares do órgão onde ela é sintetizada, não sendo encontrada em fluidos (GREIGHTON e CHARLES, 1987a).

A aprotinina por ser um inibidor de amplo espectro apresenta ação antiinflamatória, anti fibrinolítica, antiagregação plaquetária e hemostática (MCEVOY et al., 2007). Um ensaio clínico randomizado duplo cego utilizando a aprotinina no tratamento de pancreatite aguda não obteve resultados positivos (COX et al., 1980). A história da aprotinina como um anticoagulante começou em 1987, quando alguns grupos relataram que o uso deste inibidor em pacientes submetidos a cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea diminuiu a necessidade de transfusão sanguínea (WESTABY, 2008). Em 1993, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso da aprotinina nestes procedimentos cirúrgicos. Desde então a aprotinina é um dos medicamentos utilizados nestas cirurgias devido à sua extraordinária eficácia em diminuir o sangramento pós-cirúrgico, reduzir à disfunção pulmonar, e até amenizar as disfunções cognitivas que são decorrentes destes procedimentos cirúrgicos. Em 1997, o uso da aprotinina na Itália foi suspenso devido ser um produto originário de pulmão bovino e, portanto passível de contaminação pelo agente da encefalopatia bovina (CASATI et al., 2008). Diferente da sua eficácia, a existência de efeitos colaterais adversos foi controversa desde o começo (RAY et al., 2008). Em 2006, o uso da aprotinina tornou-se ainda mais polêmico quando este fármaco foi associado a um aumento do risco de falência renal, infarto do miocárdio, e de morte (MANGANO et al., 2006). Estes achados foram duramente refutados por Royston et al. (2007) e apoiados por outros grupos que apontaram o uso preferencial da aprotinina em pacientes de alto risco, um viés que poderia ter colaborado com os resultados adversos não relatados nos outros grupos de pacientes tratados com outros antifibrinolíticos (FUNARY et al., 2007; MOUTON et al., 2008). Diante destes resultados conflitantes, um ensaio prospectivo randomizado para

comparar a eficácia e efeitos colaterais da aprotinina com outros dois antifibrinolíticos (ácido ϵ -aminocaproíco e ácido tranexâmico) foi sugerido e está em andamento. Este estudo foi denominado de BART (“**B**lood Conservation using **A**ntifibrinolytics: A **R**andomized **T**rial in High-Risk Cardiac Surgery Patients”) sendo projetado para comprovar a suposta superioridade do inibidor frente aos dois outros agentes (ácido ϵ -aminocaproíco ou ácido tranexâmico). Os parâmetros definidos para o estudo foram: diminuir o sangramento maciço após a cirurgia, minimizar a utilização de qualquer produto sangüíneo, e diminuir a ameaça à vida e ou complicações pós-operatórias. Para satisfação dos padrões estatísticos, cada grupo será formado por 990 pacientes, ao todo 2970 pacientes deverão participar do estudo que conta com a participação de 25 centros Canadenses de cirurgia cardíaca e duração prevista de 4 anos. Em outubro de 2007, o conselho de monitoramento dos dados de segurança do BART informou ao FDA que a partir de uma análise provisória dos dados coletados durante 30 dias, a mortalidade no grupo tratado com aprotinina apresentou diferenças significativas estatisticamente quanto comparadas com os outros dois grupos, reforçando os resultados de Mangano et al. (2006). Após este comunicado a aprotinina foi retirada do mercado pela Bayer (Bayer HealthCare Pharmaceuticals) (em novembro de 2007) e o seu uso está temporariamente suspenso até o final do estudo ou até que novos dados mais consistentes sejam obtidos.

Apesar de toda polêmica sob seu uso clínico a aprotinina é uma ferramenta valiosa na pesquisa bioquímica e na biotecnologia. A aprotinina pode ser imobilizada em resinas para purificação de proteinases, ou servir como padrão de massa molecular em processos de separação. A aprotinina previne degradação das proteínas de interesse presentes em fluidos ou extratos a serem purificados. Como seu uso na preservação dos fatores do plasma sensíveis à proteólise, fator VIII e a fibronectina, durante os procedimentos de purificação. Além disso, também preserva órgãos e células em culturas.

1.2.1.2 Família dos inibidores de tripsina inter- α (I α I)

Os inibidores de tripsina da família inter- α foram detectados na urina de pacientes com nefro e pneumopatias e em seguida também na urina de pessoas saudáveis, ainda na primeira década do século XX (ZHUO et al., 2004). Em 1955, a proteína responsável pela atividade antitriptica da urina foi purificada e denominada de inibidor de tripsina urinário (UTI). Esta proteína, hoje conhecida como bikunina, permanece solúvel e ativa após tratamento com moderada concentração de ácidos fortes sendo também denominada de inibidor de tripsina ácido estável (ASTI) (FRIES e BLOM, 2000). Em 1960, outro inibidor de tripsina foi isolado de plasma humano e denominado de inibidor de tripsina inter- α , e posteriormente apenas de inibidor inter- α (I α I) (FRIES e KACZMARCZYK, 2003). Neste período foi também observado que pequenos componentes com atividade inibitória eram liberados quando I α I era tratado com serinoproteinasas (tripsina, plasmina e elastase). Os fragmentos polipeptídicos gerados eram idênticos ao UTI e receberam diferentes nomes HI-30, mingina, urinastatina, ulinastatina, proteína rica em ácido urônico e nefrocalina. Para eliminar a confusão causada por todos estes nomes o termo bikunina foi sugerido, para estes fragmentos, baseado na presença dos dois domínios inibitórios do tipo Kunitz característicos destes inibidores (GEBHARD et al., 1990; ZHUO et al., 2004).

O I α I é formado por três cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas homólogas de aproximadamente 75 kDa cada e pela bikunina (a cadeia leve de 16 kDa). Três diferentes cadeias pesadas são descritas: cadeia pesada 1 (HC1), cadeia pesada 2 (HC2) e cadeia pesada 3 (HC3). As cadeias pesadas não apresentam atividade inibitória e a sua similaridade entre as espécies é de 38 a 55%. Normalmente, em humanos, o I α I contém as cadeias pesadas 1 e 2, em bovinos as cadeias pesadas são 2 e 3 e em roedores, as cadeias pesadas são dos três tipos.

Um inibidor presente no plasma, formado pela bikunina (cadeia leve) e uma cadeia pesada, é denominado de inibidor pré- α (PaI) (figura 1.2.1.2.1) (FRIES e KACZMARCZYK, 2003). O inibidor pré- α apresenta a cadeia pesada 3 em todas as espécies examinadas, exceto em bovinos que contém a cadeia pesada 2 (CASTILLO e TEMPLETON, 1993). O I α I e o PaI são caracterizados por uma estrutura peculiar de proteína-glicosaminoglicana-proteína. As cadeias pesadas estão ligadas à cadeia leve através de uma ligação éster; entre o carbono 6 do resíduo de N-acetil-galactosamina da cadeia de sulfato de condroitina e o carbono α do aminoácido C-

terminal das cadeias pesadas. As cadeias de sulfato de condroitina são feitas de unidades repetidas de dissacarídeos consistindo de um N-acetil-galactosamina e um ácido glucorônico (FRIES e KACZMARCZK, 2003).

A bikunina é formada por dois domínios inibitórios do tipo Kunitz (acima mencionado) que apresentam similaridades estruturais mantidas por três pontes dissulfeto entre as cisteínas, conforme descrito no item 1.2.1.1 para a aprotinina. O domínio I (N-terminal) e o domínio II (C-terminal) têm massas molares de 7 kDa, cada. Estes domínios estão ligados entre si por um peptídeo conector, e possuem extensões N e C-terminais, que contêm de 10 a $\pm$ 25 resíduos de aminoácidos (Figura 1.2.1.2.2). A extensão N-terminal, que carrega uma cadeia de sulfato de condroitina, é facilmente liberada pela clivagem proteolítica. A sequência da bikunina de diferentes espécies tem sido determinada e estas seqüências apresentam similaridades entre si, indicando que a função da bikunina foi preservada durante a evolução. Os sítios reativos no domínio I (Met-36) e no domínio II (Arg-92) são conservados entre os mamíferos (XU et al., 1998).

A bikunina exibe uma fraca atividade inibitória contra proteases incluindo tripsina, quimotripsina, NE, catepsina G e plasmina (ZHUO et al., 2004). Mas nenhuma destas enzimas foi definida como alvo fisiológico da bikunina, levando ao questionamento se a inibição de proteases seria sua principal função. Outro fator adicional é que embora os níveis circulantes destas moléculas sejam altos 150 a 500 μ g/mL, eles representam apenas 5% da atividade inibitória total do plasma. As moléculas da família I α I funcionam como transportadoras das proteinases transferindo-as para seus inibidores fisiológicos. O uso de modificações sítios específicas e fragmentos gerados da bikunina têm mostrado que o domínio II inibe todas as proteinases e apresenta maior atividade específica contra fator Xa e calicreína plasmática que a molécula intacta (FRIES e BLOM, 2000; FRIES e KACZMARCZYK, 2003).

Figura 1.2.1.2.1 – Esquema do inibidor de tripsina inter- α e do inibidor pré- α . O inibidor inter- α consiste de duas cadeias pesadas (HC1 e HC2) ligadas covalentemente a bikunina pelo sulfato de condroitina. O inibidor pré- α consiste de uma cadeia pesada (HC3) ligada covalentemente ao sulfato de condroitina da bikunina.
 FONTE: modificada de Fries e Kaczmarczyk (2003).

Figura 1.2.1.2.2 – Esquema da estrutura da Bikunina. A molécula da bikunina é formada por dois domínios tipo Kunitz, domínio I (N-terminal) e o domínio II (C-terminal) ligados entre si por um polipeptídeo. Os quadrados brancos e cinzas representam os resíduos de açúcar não sulfatados e sulfatados, respectivamente.
FONTE: modificado de Fries e Kaczmarczyk (2003).

As cadeias pesadas da família IαI são codificadas por pelo menos quatro genes, *ITIH1*, *ITIH2*, *ITIH3* e *ITIH4*. As seqüências dos cDNAs destes genes são homólogas, o que implica na ocorrência de vários eventos de duplicação gênica de um gene *ITIH*. Todas as cadeias pesadas são sintetizadas no fígado, como precursores que sofrem processamento pós-traducional. As cadeias pesadas HC1, HC2 e HC3 contêm um sítio de clivagem conservado e são capazes de formar ligações covalentes com a bikunina via glicosaminoglicana. Esta seqüência de clivagem

conservada no C-terminal está ausente no HC4, impedindo assim sua ligação a bikunina (HAMM et al., 2008). Himmelfarb et al. (2004) descreveram um novo membro da família do gene *ITIH* chamado *H5*, seu mRNA é expresso majoritariamente na placenta e glândula mamária e fracamente em outros tecidos.

Além dos cinco genes *ITIH*, um outro gene o *AMBP* precursor da bikunina está envolvido na síntese da maioria dos membros da família IαI. O gene *AMBP* é formado por dez exons, seis exons que codificam o α1-microglobulina e 4 exons que codificam a bikunina, separados por um grande intron. Após a tradução o polipeptídio sofre uma clivagem liberando a α1-microglobulina e a bikunina, estas duas proteínas não são estrutural ou funcionalmente relacionadas. A α1-microglobulina é uma proteína de 25 kDa que pertence à família das Lipocalinas que são encontradas livres ou complexadas com outras proteínas plasmáticas. Esta proteína tem propriedades imunoregulatórias e está envolvida no catabolismo do grupo heme (SALIER et al., 1996). Os genes *AMBP* e *ITIH* são transcritos no fígado, que é a principal fonte das proteínas plasmáticas da família IαI.

As cadeias pesadas e a bikunina são sintetizadas como precursores com extensões C e N-terminais. No complexo de Golgi, a cadeia de sulfato de condroitina liga-se ao precursor da bikunina e as extensões N e C-terminais das cadeias pesadas são clivadas. A extensão N-terminal do precursor da bikunina é clivada, proteoliticamente no complexo de Golgi ou nas vesículas secretórias, liberando a proteína plasmática α1-microglobulina, e levando a formação do inibidor maduro pré-α (FRIES e BLOM, 2000; FRIES e KACZMARCZYK, 2003). Não se sabe por que algumas moléculas de bikunina ligam-se a HC1 e HC2, enquanto outras se ligam somente a HC3. O sulfato de condroitina isolado do IαI, mas não de PαI, apresenta resíduos de galactosamina sulfatados na região de ligação, isto pode contribuir para a diferença da composição de polipeptídio dos dois inibidores (FRIES e BLOM, 2000).

A bikunina possui também atividade antiinflamatória ao suprimir a síntese de citocinas induzida por lipopolissacarídeos (LPS). Este efeito é devido à inibição do aumento de Ca^{+2} no citoplasma induzido pelo LPS, sugerindo o bloqueio dos canais de cálcio. A bikunina inibe a contração do músculo liso vascular induzida por noradrenalina, e a contração do músculo liso uterino induzida por LPS. Ela também protege as células amnióticas dos estímulos de interleucina 1β e do fator de necrose tumoral β (TNF β). Estes efeitos podem ser explicados pelo bloqueio do influxo de Ca^{2+} na célula. Experimentos “in vitro” mostram que a bikunina inibe a

formação de cristais de oxalato de cálcio. “In vivo” este efeito é indicado pela observação de baixos níveis de bikunina na urina de pacientes com cálculo renal (FRIES e BLOM, 2000).

A bikunina é um medicamento utilizado no Japão e na China, para o tratamento de pancreatite aguda. Ela é purificada a partir de urina humana e comercializada pela indústria farmacêutica Mochida Pharmaceutical, Tokyo, Japan com o nome de Miraclid® (MATSUNO et al., 2006). Existe um número considerável de estudos em modelos animais utilizando a bikunina para tratar injúria pulmonar causada pela isquemia e reperfusão, síndrome do desconforto respiratório e outros processos inflamatórios. Vários estudos clínicos de fase I e II estão em andamento utilizando este inibidor em pacientes submetidos a cirurgias pancreáticas, cardíacas e na sepse (UEMURA et al., 2008; TSUJIMURA et al., 2008).

As proteínas IαI ou PαI são utilizadas como prováveis marcadores moleculares de doenças. Lull et al. (2008) analisaram por SDS-PAGE bidimensional e espectrometria de massa pela técnica de MALDI-TOF, o plasma de 10 crianças que sofreram cirurgias cardiopulmonares com circulação extracorpórea. Eles identificaram 13 proteínas plasmáticas com expressão alterada entre elas IαI. Hamm et al. (2008) investigaram a expressão gênica dos genes da família *H* e *AMBP* em diferentes tumores humanos (mama, endométrio, ovário, colo uterino, estômago, intestino delgado, colón, reto, pulmão, tireóide, próstata, rins e pâncreas) usando técnicas de cDNA e imunohistoquímica. Eles encontraram que os genes *ITIH* estão sub-regulados em tumores sólidos, incluindo câncer de mama, colón e pulmão. A sub-regulação destes genes nestes cânceres pode estar associada com o início ou a progressão destas doenças. Garantziotis et al. (2008) verificaram que IαI inibe a fagocitose “in vitro” e em modelo murino de injúria pulmonar dependente do complemento inibe a ativação deste através das vias clássica e alternativa com conseqüente redução da injúria pulmonar. Estes autores descrevem que esta nova função do IαI fornece uma explicação para o efeito favorável deste inibidor na sepse e abre novas possibilidades para seu uso em doenças inflamatórias. Opal et al. (2007) mediram a concentração de IαI e PαI em plasma de pacientes com sepse severa para determinar a importância clínica destes inibidores nesta patologia. Eles analisaram o plasma de 265 pacientes em um estudo clínico multicêntrico de fase III. Os resultados mostraram que os níveis de IαI e PαI (nitidamente reduzidos) foram inversamente correlacionados com a interleucina-6. A manutenção da baixa concentração destes inibidores durante a sepse não é um bom prognóstico.

Há poucos trabalhos sobre a purificação desta família de inibidores. Pelo menos três trabalhos foram encontrados, dois que purificaram a bikunina a partir de pool de plasma humano, e um trabalho que purificou I α I recombinante a partir de células COS (MICHALSKI et al., 1994; MIZON et al., 1997; MARTIN-VANDELET et al., 1999). A presença da bikunina numa variedade de tecidos humanos e de roedores (cérebro, fígado, rins, intestino e pâncreas) era principalmente atribuída à reabsorção dos inibidores I α I, P α I do plasma. Entretanto a bikunina e as cadeias pesadas H1, H2 e H3 também são expressas no pulmão normal e canceroso (BOURGUIGNON et al., 1999).

A função fisiológica dos membros da família dos inibidores de inter- α (P α I, I α I e bikunina) ainda não é completamente conhecida, entretanto, os dados dos vários estudos clínicos e sua utilização para reduzir inflamação em diferentes patologias principalmente no Japão deste 1985, tornam estas moléculas dignas de maior atenção. Provavelmente os japoneses encontraram na bikunina humana uma forma alternativa da aprotinina bovina, com êxito para tratar pancreatite aguda e sepse.

1.2.2 Superfamília das Serpinas

As serpinas constituem a maior família dos inibidores de proteinases. Os genes que codificam as serpinas estão presentes em animais, plantas, bactérias e vírus. Esta família contém mais de 1500 membros (LAW et al., 2006).

As serpinas são moléculas grandes com aproximadamente 350 a 500 resíduos de aminoácidos se comparadas a outros inibidores de serinoproteinases, por exemplo, aprotinina com 58 resíduos. A identificação inicial dos membros desta família foi baseada na observação da similaridade na estrutura primária de três proteínas: antitrombina, α_1 -antitripsina e ovalbumina. As seqüências primárias destas proteínas apresentam 30% de identidade que responde pela estrutura terciária conservada das serpinas; três folhas β -pregueadas e 8 a 9 α -hélices (GETTINGS, 2002). Um estudo filogenético desta superfamília dividiu as serpinas dentro de 16 clados (A - P). As proteínas são chamadas de SERPINXy, onde X é o clado e y é o número da serpina dentro clado (tabela 1.2.2.1) (IRVING et al., 2000). O nome serpina para descrever as propriedades funcionais desta superfamília não é apropriado, pois apesar da maioria de seus membros serem inibidores de serinoproteinases da família quimotripsina, alguns membros inibem proteinases de outras classes, por exemplo; a serpina viral CrmA e a antiprotease 3 citoplasmática que inibem cisteinoproteases. Adicionalmente alguns membros não são inibidores de proteinases desempenhando entre outras funções: transporte de hormônios (globulina transportadora de corticosteróide - SERPINA6, globulina transportadora de tiroxina – SERPINA7), regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio SERPINA8), inibidor de metástase (maspina - SERPINB5) (SILVERMAN et al., 2001; GETTINGS et al., 2002).

As serpinas humanas é um dos grupos mais estudados e caracterizados devido à sua importância em processos fisiológicos altamente regulados como; coagulação sanguínea, fibrinólise e inflamação, e o seu envolvimento em patologias como enfisema pulmonar e angioedema hereditário. O α_1 -antitripsina, o α_2 -antiplasmina, o inibidor C1 e a neuroserpina são exemplos de serpinas com importantes funções fisiológicas.

Tabela 1.2.2.1 – Classificação das serpinas em Clados.

Nome do clado	Letra
α_1 -inibidor de proteinase (α_1 -AT)	A
Ov-Serpina intracelular	B
Antitrombina	C
Cofator II heparina	D
Inibidor do ativador de plaminogênio	E
α_2 -antiplasmina	F
Inibidor C1	G
Chaperonina 47 kDa	H
Neuroserpina	I
caranguejo-ferradura (<i>Limulus polyphemus</i>)	J
Insetos	K
Nematódeas	L
Schistosoma spp	M
Serpina viral 1 - 2	N
Serpina viral 3	O
Planta	P

FONTE: Gettings (2002).

O α_1 -AT é o arquétipo da superfamília das serpinas, este inibidor apresenta amplo espectro de inibição de serinoproteinasas, inibindo tripsina, quimotripsina, trombina, calicreína, plasmina, elastase pancreática e elastase neutrofílica. Sua principal função parece ser a inibição da NE de forma rápida e irreversível (MATTESS et al., 2001). No trato respiratório α_1 -AT contribui com mais de 90% da proteção funcional contra NE nas paredes alveolares (DÖRING, 1999; van GENT et al., 2003). O α_1 -AT é o inibidor de serinoproteínase mais abundante no plasma humano (1 a 2 mg/mL) e o seu tempo de atividade na circulação (meia vida) é de 4 a 5 dias (ARCHIBALD et al., 1990). Ele é sintetizado principalmente pelos hepatócitos, mas é também produzido em pequenas quantidades pelos macrófagos alveolares (PAAKKO et al., 1996). Durante a inflamação a concentração deste inibidor é aumentada, visto que α_1 -AT é uma proteína de fase aguda e é o principal inibidor de NE presente no local (GETTINGS, 2002).

O α_1 -AT maduro é uma glicoproteína de cadeia única de 394 resíduos de aminoácidos e massa molar de 52 kDa. A cadeia polipeptídica deste inibidor inclui um resíduo de cisteína, dois resíduos de triptofano e nove resíduos de metionina (CARP et al., 1982; JOHSON e TRAVIS, 1977). A oxidação da Met-358 leva a uma perda da atividade antielastase, efeito similar foi observado para a Met-351 (TAGGART et al., 2000). Doze % da sua massa molecular corresponde a carboidratos. A heterogeneidade deste inibidor é devida a modificações pós-traducionais principalmente nos 3 complexos N-glicanas covalentemente ligados aos resíduos de asparagina 46, 83 e 247 (CARREL et al., 1981). Os resíduos de ácido siálico dos N-glicanas

conferem ao α_1 -AT uma carga negativa alta. E a glicosilação correta é importante uma vez que diferenças na N-glicosilação podem influenciar no “folding”, na atividade biológica e na meia vida da proteína (KOLARICH et al., 2006).

A estrutura terciária de α_1 -AT apresenta nove α -hélices e três folhas β -pregueadas (A, B e C). O “loop” do centro reativo (exposto para a interação com a proteinase alvo) é formado por quinze resíduos de aminoácidos. O mecanismo inibitório de α_1 -AT, como o das serpinas, é irreversível do tipo substrato suicida. Após a interação com a proteinase o “loop” do sítio reativo é clivado e o inibidor torna-se inativo (SILVERMAN et al., 2001).

O gene do α_1 -AT humano consiste de 12 kb, e é composto de sete exons separados por seis introns. Há um promotor específico para hepatócitos e um promotor alternativo que é utilizado em monócitos e macrófagos. O maior local de produção do α_1 -AT é no fígado embora os macrófagos alveolares produzam aproximadamente 1% da quantidade total do inibidor. A interleucina 6 e outras citocinas relacionadas, como a oncostatina M, tem efeito estimulante na produção de α_1 -AT pelos hepatócitos. Nos macrófagos alveolares a produção de α_1 -AT pode ser estimulada pelas moléculas pró-inflamatórias incluindo interleucina- β (IL- β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e LPS.

A deficiência de α_1 -AT é uma doença hereditária caracterizada pela diminuição plasmática deste inibidor e classicamente relacionada com o desenvolvimento prematuro de enfisema pulmonar. Mais de 100 alelos de α_1 -AT foram identificados e pelo menos 35 estão associados com a deficiência, incluindo o alelo-Z que é a causa mais comum da deficiência hereditária. Devido a uma simples mutação no domínio móvel (Glu-342), o mutante (mutante Z) sofre alterações conformacionais anormais causando a polimerização do inibidor. O α_1 -AT polimerizado é retido dentro dos hepatócitos, consequentemente os níveis plasmáticos e pulmonares deste inibidor é diminuído (LOMAS, 2005). Esta condição aumenta o risco de enfisema pulmonar na 3ª ou 4ª década da vida e também predispõe o desenvolvimento de doenças hepáticas, paniculite cutânea, aneurisma arterial, bronquiectasia e doença renal (MULGREW et al., 2007).

A partir do estabelecimento da conexão entre níveis reduzidos de α_1 -AT e o desenvolvimento de enfisema pulmonar na década de 60, vários estudos e ensaios clínicos foram realizados com a reposição exógena de α_1 -AT purificado de plasma humano (RUSSI, 2008). A

terapia de reposição com preparações de α_1 -AT purificado a partir do “pool” de plasma humano é a terapia de escolha recomendada pela “American Thoracic Society” para pacientes com deficiência hereditária grave de α_1 -AT e obstrução das vias aéreas. Atualmente o α_1 -AT é comercializado por três diferentes produtores, e todos purificam este inibidor a partir do “pool” de plasma humano (Tabela 1.2.2.2). Estas preparações são administradas por via intravenosa na dose de 60 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana. A administração deste inibidor normalizaria os níveis circulantes de α_1 -AT, no limiar de 11 μ M protegendo o parênquima pulmonar. Embora os benefícios biológicos desta terapia estejam bem estabelecidos, os clínicos ainda são controversos. A tomografia computadorizada para a medida do desenvolvimento do enfisema de pacientes que receberam ou não esta terapia mostra que sua progressão pode ser até menor em pacientes que não utilizaram o inibidor (MULGREW et al., 2007).

Tabela 1.2.2.2 – Formas comerciais disponíveis de α_1 -AT.

Produto	Indústria farmacêutica	Fonte
Prolastin	Talecris Biotherapeutics Research triangle Park, North Carolina	“pool” de plasma humano
Aralast	Baxter, Deerfield , Illinois	“pool” de plasma humano
Zemaira	ZLB-Bering, King of Prússia, Pennsylvania	“pool” de plasma humano

1.2.3 Família dos Antileucoproteinases: SLPI e elafina

SLPI e elafina são inibidores de proteinases que apresentam atividades antibacteriana, antiinflamatória e participam da imunidade inata (DOUMAS et al., 2005; WILLIAMS et al., 2006; MOREAU et al., 2008). Estes inibidores são membros da família de proteínas que contém domínios WAP “whey acidic protein” (proteína ácida do soro lácteo). Estas proteínas são caracterizadas por apresentarem massa molecular baixa, serem secretadas e possuírem um núcleo protéico contendo 4 pontes dissulfeto (domínio WAP). A família participa na regulação do crescimento e diferenciação celular e do remodelamento da matriz extracelular, funções relacionadas ou não com a atividade antiproteolítica, haja vista alguns de seus membros não serem inibidores. Devido à diversidade de funções das proteínas WAP, seus membros são agrupados dentro de famílias baseados na sua funcionalidade. O SLPI e a elafina foram agrupados em uma família denominada antileucoproteinase (ALP). A molécula de SLPI é formada por dois domínios WAP e a molécula de elafina é formada por apenas um (DRENTH et al., 1980; SCHALKWIJK et al., 1999; KING et al., 2003). Outra classificação descrita na literatura para SLPI e elafina é como membros da família Queloniana. A classificação é devida à observação que os dois domínios WAP (I e II) de SLPI e WAP da elafina são similares ao domínio WAP do inibidor da tartaruga vermelha marinha (*Caretta caretta*) (SEEMULLER et al., 1986; CHEN et al., 2005; MORREAU et al., 2008).

Uma terceira classificação é feita com base nas similaridades estatisticamente significantes das seqüências de aminoácidos. Nesta classificação o SLPI e elafina pertencem à família I17 (RAWLINGS et al., 2004). A literatura utiliza as três classificações descritas acima para estes inibidores. Estes dois inibidores de proteinases também foram diferentemente denominados de acordo com o local ou material de onde foram purificados. Desta forma SLPI é sinônimo de ALP (antileucoproteinase), de HUSI-I (inibidor I de plasma seminal humano), de CUSI (inibidor de secreção do colo uterino), de BI (inibidor brônquico) e de MPI (inibidor de proteinase purificado de muco), e a elafina de ESI (inibidor brônquico específico de elastase), e de SKALP (antileucoprotease derivada da pele) (FRITZ, 1988; SALLENAVE e RYLE, 1991). Atualmente a denominação em uso é SLPI e elafina (MORREAU et al., 2008).

o SLPI é um membro da família “Whey Four Disulfide Core” (WFDC). SLPI é expresso constitutivamente em uma variedade de células epiteliais incluindo os epitélios respiratórios, intestinais, amnióticos e queratinócitos (WILLIAMS et al., 2006).

SLPI inibe as proteinases NE, catepsina G, tripsina, quimotripsina e quimase (SALLENAVE, 2000). SLPI é encontrado associado às fibras elásticas no pulmão e na pele indicando um papel relevante na proteção direta da elastina contra proteólise (WILLIAMS et al., 2006).

A pré-elafina ou trapina 2 é uma proteína não glicosilada de 9,9 kDa, e 95 aminoácidos organizados em dois domínios (Figura 1.2.3.2 A). O 1º domínio (N-terminal) não apresenta atividade inibitória, é formado por 38 aminoácidos contendo motivos repetitivos de variações da sequência Gly-Gln-Asp-Pro-Val-Lys. Este domínio é denominado de cimentoína e é o substrato para a enzima transglutaminase (Figura 1.2.3.2 A). O 2º domínio (C-terminal) é a elafina, constituída por um domínio WAP com 40% de homologia com o SLPI e com atividade inibitória (1.2.3.2 A e 1.2.3.2 B) (MOREAU et al., 2008). A elafina foi purificada pela 1ª vez a partir da pele e posteriormente de escarro de pacientes com bronquite crônica (WIEDOW et al., 1990; SALLENAVE e RYLE, 1991).

O gene da pré-elafina ou trapina 2 é o *PI3*, composto de três exons e dois introns, e também localizado no cromossomo 20q 12-13. O gene *PI3* pertence à família das trapinas (acrônimo em inglês para substrato de transglutaminase e proteína contendo o domínio WAP). As trapinas são numeradas de acordo com a sua ordem de identificação e a pré-elafina ou trapina 2 foi, portanto, a segunda trapina a ser identificada (SCHALKWIJK et al., 1999). O gene *PI3* é constitutivamente expresso em epitélios (pele, pulmão, cavidade oral e vaginal) que são continuamente sujeitos aos estímulos inflamatórios. Embora a quantidade de pré-elafina na pele seja pequena sua expressão é induzida por trauma, irritação, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , e pela elastase (MOREAU et al., 2008). Elafina inibe elastase pancreática porcina, NE e proteinase 3, apresentando atividade inibitória mais restrita que SLPI. O sítio reativo da elafina é formado pelo resíduo Ala-24 e pelo resíduo Met-25 (P1-P1'), e seu “loop” inibitório é formado pelos resíduos de Leu-20 a Leu-26 (Figura 1.2.3.2) (TSUNEMI et al., 1996).

A

1 MRASSFLIVV VFLIAGTLVL EAAVTGVPVK GQDTVKG RVP FNGQDPVKGGQ
 VSVKGQDKVK AQEPVKGPVS TKPGSCPIIL IRCAMLNPPN RCLKD TDCPG
 ILLCCEGSCG MACFVPQ 117

B

Figura 1.2.3.2 – Sequência da estrutura primária da pré-elafina e elafina. **A** - Sequência da pré-elafina com 117 resíduos de aminoácidos. Peptídeo sinal hidrofóbico (Met-1 a Ala-22 apresentados em marrom), domínio N-terminal (1º domínio) (Ala-23 a Lys-60 apresentados em verde) e domínio C-terminal (2º domínio) (Ala-70 a Gln-117 apresentados em preto). O sítio reativo da elafina é formado pelos resíduos Ala²⁴ e Met²⁵. NCBI (NP_002629) **B** - representa a estrutura secundária da elafina, com as 4 pontes dissulfeto. Informativo do produto Sigma-Aldrich.

SLPI e elafina apresentam atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e participam da cicatrização de feridas.

A capacidade da saliva humana de inibir o vírus HIV (vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida) levou a identificação de SLPI como um dos fatores responsáveis por este efeito (SHUGARS, 1999). Estudos “in vitro” mostram que SLPI impede a ligação da anexina II (proteína ligante de fosfolipídios da célula hospedeira) com a fosfatidilserina do vírus (MA et al., 2004). E a elafina impede a infecção de células T provavelmente por mecanismo semelhante (MOREAU et al., 2008).

Tanto SLPI quanto elafina apresentam atividade antimicrobiana “in vitro” e “in vivo”. SLPI é ativo contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus* grupo A, contra os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Cândida albicans*. Elafina possui atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O mecanismo da atividade antimicrobiana destes inibidores não é conhecido, mas pode ser explicado pela interação destes dois inibidores catiônicos com a membrana aniônica da bactéria, levando a sua desestabilização (WILLIAMS et al., 2006; MOREAU et al., 2008).

SLPI reduz o dano tissular em vários modelos de fibrose e enfisema pulmonar ao impedir a ativação do fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), responsável pela síntese de vários

mediadores pró-inflamatórios, durante a inflamação pulmonar. A elafina pode suprimir a inflamação em modelos de infarto do miocárdio, aterosclerose, e miocardite viral (WILLIANS et al., 2006). Os efeitos anti-inflamatórios da elafina são exercidos também pela inibição da ativação dos fatores de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1, heterodimérica composta dos oncogenes) e NF- κ B, induzidos pelo LPS, em linhagens de células monocíticas U937 (MOREAU et al., 2008). O complexo SLPI-LPS impede a ligação de LPS aos receptores CD4 dos macrófagos. A elafina e pré-elafina ligam-se ao LPS e dependendo do meio extracelular conduzem a resposta formada pela imunidade inata. SLPI e elafina estão, portanto envolvidos no desencadeamento da resposta imune inata e na modulação da resposta imune adaptativa (WILLIANS et al., 2006).

O papel de SLPI no reparo de tecidos é estimular a proliferação celular do tecido cutâneo através do aumento da expressão gênica dos sinais pró-proliferativos (HIEMSTRA, 2002). SLPI também é capaz de aumentar a produção do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) pelos fibroblastos pulmonares contribuindo para a regulação da divisão celular mesenquimal. (WILLIANS et al., 2006).

SLPI e elafina pelas suas inúmeras funções podem ser usadas como moléculas promissoras no tratamento de diversas doenças. A forma recombinante de SLPI (rSLPI) vem sendo utilizada no tratamento da fibrose cística em modelo animal e em humanos (MCELVANEY et al., 1993; VOLGMEIER et al., 1996). Entretanto, os resultados obtidos indicam ainda a necessidade de melhorias na forma de administração do medicamento e de melhorias no próprio processo de produção do inibidor em larga escala (MOREAU et al., 2008).

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal a purificação de um inibidor de serino proteinase do tipo aprotinina a partir de pulmões suínos, matéria prima, utilizada no Instituto Butantan, para a produção de surfactante pulmonar e fonte de pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas com aplicações terapêuticas.

2.2 Objetivos específicos

- 1 - Desenvolver e utilizar metodologias adequadas à extração e isolamento da aprotinina suína;
- 2 - Isolar e purificar outros inibidores presentes nos extratos pulmonares suínos obtidos também pela metodologia de extração da aprotinina;
- 3 - Caracterização da aprotinina suína e dos outros inibidores ácidos resistentes também presentes nos extratos pulmonares suínos;
- 4 - Adquirir conhecimento para a purificação de inibidores de serinoproteinases de outras fontes biológicas.

2.3 Justificativa

Uma das linhas de pesquisas desenvolvidas no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, onde atuamos, estuda o aproveitamento de tecidos e órgãos de animais como fonte para isolamento, purificação e escalonamento de produtos biológicos de interesse para a saúde humana (KUBRUSLY et al., 2004). Este grupo tem desenvolvido pesquisas utilizando como matéria-prima básica pulmões suínos doados pela Sadia. O Brasil é o quarto produtor mundial de suínos (o primeiro é a China, seguido pela União Européia e Estados Unidos da América) (Revista Rural on line) e normalmente os pulmões destes animais não são consumidos pela população ou processados pelas indústrias alimentícias.

Os inibidores de proteases são moléculas promissoras para uso terapêutico em diversas patologias, não somente naquelas onde o equilíbrio proteinase / inibidor foi quebrado, mas também em processos inflamatórios e infecciosos. Estes inibidores são obtidos a partir de fontes naturais entre estas, os pulmões bovinos, ou são recombinantes. Atualmente apenas os inibidores naturais são utilizados como fármacos, entretanto alguns inibidores recombinantes já foram testados em ensaios clínicos de fases I e II. Os inibidores de serinoproteinases apresentam um alto valor agregado e o Brasil não produz estes inibidores para utilização como insumo ou medicamento.

Portanto, a utilização de pulmões suínos como matéria-prima para obtenção destes inibidores foi investigada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os pulmões suínos utilizados neste trabalho foram doados pela *Sadia S/A*. Os pulmões bovinos foram adquiridos do frigorífico e comércio de alimentos *MARFRIG LTDA*. A aprotinina bovina comercial, o α_1 -antitripsina humano, o soybean, a tripsina pancreática bovina, a elastase de neutrófilo, o anticorpo policlonal contra α_1 -antitripsina humano, o substrato benzoil arginina p-nitroanilina (BApNA) e a resina tripsina-agarose foram adquiridos da *Sigma*, Estados Unidos da América. O anticorpo policlonal contra SLPI recombinante de camundongo foi adquirido da *Calbiochem*, Alemanha. O anticorpo policlonal contra a porção C-terminal da bikunina foi adquirido da *Santa Cruz Biotechnology, Inc*. As resinas Sepharose ativada CNBR, a coluna cromatográfica modelo XK 16 (16 x 200 mm), e as colunas HiTrap: Q-Sepharose, SP-Sepharose, Heparina-Sepharose e HiPrep™ Desalting foram adquiridas da *Ge Healthcare*. Os “kits” e enzimas utilizados nos métodos de biologia molecular foram adquiridos da *Invitrogen Life Technologies*. Todos os outros reagentes utilizados no desenvolvimento dos experimentos foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos analíticos

3.2.1.1 Determinação da inibição de tripsina

Os ensaios de inibição de tripsina foram realizados de acordo com a metodologia descrita por (KASSELL, 1970) adaptada para placa de 96 poços (capacidade total de 300 µL). Os ensaios foram realizados a 37 °C utilizando um leitor de placas Multiskan Ex (Labsystems Uniscience).

Em cada poço foram adicionados: 20 µL de tripsina (100 µg/mL em solução HCl 1 mM), amostra e tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 para um volume final de 180 µL. A placa foi agitada, manualmente, e mantida a 37 °C por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 100 µL de BApNA 0,1% (m/v). Novamente, a placa foi homogeneizada e mantida por 10 minutos a 37 °C. Após esta segunda incubação, a hidrólise do substrato foi interrompida pela adição de 20 µL de ácido acético 50% (v/v). A absorbância foi registrada a 405 nm. O controle positivo foi formado de 20 µL de tripsina, 160 µL do tampão descrito acima e 100 µL do substrato, o branco foi constituído de 180 µL do tampão de ensaio e 100 µL de substrato. A concentração de tripsina foi calculada de acordo com a equação 1 (Trypsin assay worthington Biochemistry). Uma unidade de inibição de tripsina (atividade inibitória específica) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio, e calculada como descrito na equação 2.

$$Tripsina(mg / mL) = A_{280nm} \times 0,70 \quad (1)$$

$$UI = \frac{(A_{405nm1} - A_{405nm2})}{(A_{405nm1} - A_{405nm0})} \times 2\mu g \quad (2)$$

A_{405nm1} = controle positivo (apenas tripsina)

A_{405nm2} = amostra

A_{405nm0} = Branco (apenas tampão de ensaio e substrato)

3.2.1.2 Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteína total foi determinada utilizando o kit “BCA – Protein assay kit BCA” (Pierce, EUA), baseado no método do ácido bicinconínico. A metodologia utilizada possui sensibilidade para determinar concentrações de proteína de 5 a 250 µg/mL.

A dosagem foi feita utilizando microplaca de 96 poços. Vinte e cinco µL da amostra ou do padrão (Solução de BSA) foram pipetados nos respectivos poços. Em seguida, 200 µL da mistura do reagente A e B (formada por 50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B) foram adicionados em cada poço. A microplaca foi homogeneizada, manualmente, e mantida a 37 °C por 30 minutos. A absorbância foi registrada a 570 nm utilizando um leitor de placas Multiskan Ex (Labsystems Uniscience).

3.2.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (LAEMMLI, 1970) foi realizada com a finalidade de caracterizar o grau de pureza das amostras obtidas em cada etapa de purificação. O gel foi submetido a uma corrente constante de 30 mA à temperatura ambiente. Os padrões de massas molares utilizados foram o “low marker” (GE Healthcare) com padrões de 94 - 67 - 45 - 30 - 20 e 14 kDa ou o “ultra low marker” (Sigma) com padrões de massas molares de 27 - 17 - 14 - 6,5 - 3,5 e 1 kDa. Os géis foram corados utilizando as técnicas da coloração com prata (BLUM et al., 1987) ou da coloração com “coomassie blue” (MERRIL, 1990).

3.2.1.4 Zimografia reversa

A zimografia reversa é uma ferramenta efetiva para a caracterização e isolamento de inibidores protéicos de proteinase. Essa técnica baseia-se na separação de inibidores em um gel de SDS-PAGE contendo um substrato protéico copolimerizado, como caseína ou gelatina. Após a eletroforese, o gel é incubado com uma solução tampão contendo a proteinase para que ocorra a digestão do substrato pela enzima proteolítica. O substrato protéico não digerido permanece onde as moléculas de inibidores estão localizadas sendo corados como bandas azuis pelo “Coomassie blue” (LE e KATUMA, 2004).

A zimografia reversa foi feita utilizando gel de SDS-PAGE 15% contendo 1 mg/mL de gelatina como substrato protéico copolimerizado. As amostras e os padrões comerciais de inibidores de serino proteinases foram completamente secos e diluídos em 15 µL de tampão de amostras (condições não redutoras e sem aquecimento) e submetidas à eletroforese utilizando 30 mA, à temperatura ambiente. Após a migração eletroforética, o gel foi lavado 3 vezes de 15 minutos cada com Triton X-100 2,5% (v/v). A seguir, o gel foi lavado abundantemente com água ultrapurificada e incubado durante 8 ou 2 horas à 37 °C com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,8 acrescido de NaCl 0,2 M, CaCl₂ 10 mM e tripsina 15 µg/mL. Após o período de incubação, o gel foi corado com “coomassie blue”. As zonas coradas evidentes sobre o fundo digerido indicam a presença de inibidores de serinoproteinases.

3.2.1.5 Imunoensaio do tipo “Western Blot”

A transferência eletroforética de proteínas imobilizadas separadamente no gel de SDS-PAGE para a superfície de membranas torna essas proteínas acessíveis a vários reagentes e sondas e assim aptos para futuras caracterizações. Com a finalidade de caracterizar a identidade da proteína purificada foi realizada análise imunoenzimática do tipo “western blot”.

Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado por 20 minutos com tampão de transferência Towbin (TOWBIN et al., 1979). E a membrana de PVDF foi incubada por 5

segundos em metanol, 5 minutos em água ultrapurificada e 10 minutos no mesmo tampão de transferência.

As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF em uma cuba específica (GE Healthcare) à corrente constante de 300 mA por 2 horas. Após a transferência, a membrana teve seus sítios inespecíficos bloqueados “overnight” a 4 °C com solução PBS / soro fetal bovino 10% (v/v). Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes de 10 minutos cada com solução PBS / Tween 20 0,05% (v/v) (PBS/T). Na seqüência, a membrana foi incubada com o anticorpo primário em diluições pré-determinadas, por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação e, novamente, lavada como descrito acima. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG específico conjugado com peroxidase por duas horas a temperatura ambiente, e a reação imunoenzimática foi visualizada com solução de DAB 1 mg/mL, H₂O₂ 0,11% (v/v) em PBS pH 7,4.

Anticorpos primários utilizados:

- 1- Anticorpo policlonal produzido em coelho contra a aprotinina bovina comercial. Uma coelha de aproximadamente 2,0 kg foi imunizada via intramuscular, na região da coxa, com uma mistura de 50 µg de aprotinina bovina comercial (A 4529) e 200 µL de adjuvante completo de Freund. Uma dose reforço de igual concentração misturada ao adjuvante incompleto de Freund foi aplicada via intramuscular após oito dias. A sangria foi feita no 30º dia após a inoculação. A diluição utilizada para este anticorpo foi 250.
- 2- Anticorpo policlonal contra SLPI recombinante de camundongo produzido em coelho (Calbiochem, IM 1001). As diluições utilizadas para este anticorpo foram 3000 e 5000.
- 3- Anticorpo policlonal contra α_1 -antitripsina humano produzido em coelho (Sigma, A0409). A diluição utilizada para este anticorpo foi 100.

3.2.1.6 Imunoensaio do tipo Elisa – método indireto

Placas de fundo plano de 96 poços (Coastar, Corning) foram previamente sensibilizadas com 1,0 µg de proteína diluída em 50 µL de tampão (carbonato/bicarbonato 0,5 M pH 9,6) por poço. As placas foram incubadas a 4 °C “overnight”. Após a incubação, as placas foram lavadas

com PBS contendo Tween-20 0,05% (PBS-T) por três vezes. E posteriormente, bloqueadas a 37 °C por 2 horas com 100 µL de PBS-T contendo soro fetal bovino 10% (v/v) em cada poço. Após este tempo, uma nova lavagem foi feita como descrito acima. Cinquenta µL do anticorpo policlonal anti SLPI diluído 1: 2000 em PBS-T foram adicionados em cada poço, e a placa mantida por 2 horas a 37 °C. Decorrido o tempo de incubação, a placa foi novamente lavada, e 50 µL de soro de cabra anti IgG de coelho conjugado a peroxidase (diluído 1: 20000 em PBS-T) foram adicionados em cada poço. E a placa foi mantida a 37 °C por 1 h. Após este tempo, a placa foi lavada e 50 µL da solução de O- fenilenediamina 0,2% (em tampão citrato de sódio 0,1 M / fosfato de sódio monobásico 0,2 M pH 5,0 e H₂O₂ 0,05%) foram adicionados em cada poço, e a placa incubada durante 15 minutos ao abrigo da luz. O desenvolvimento da cor foi interrompido pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 4,5 M. A absorbância foi lida a 492 nm em um leitor de placas Multiskan Ex (Labsystems Uniscience).

3.3 Métodos de biologia molecular

3.3.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de pulmão bovino (controle positivo) e suíno (amostra) utilizando o reagente DNAzol (Invitrogen life Technologies) com algumas modificações, descritas abaixo.

O pulmão bovino e o pulmão suíno (300 mg) foram homogeneizados, separadamente, com 6 mL de DNAzol por 3 minutos em um “Omni-mixer” (Sorvall), e a seguir centrifugados a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante foram adicionados 50% (v/v) de etanol (100%) a mistura foi vertida três vezes e mantida em repouso por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12800 g por 10 minutos a 4 °C. O pellet, sedimento de DNA, foi lavado com 5 mL de etanol 75% (v/v) e centrifugado a 12800 g durante 15 minutos a 4° C, este procedimento foi repetido três vezes. Após a última lavagem, o tubo foi vertido e seco à temperatura ambiente. O sedimento de ácido nucléico foi ressuspensionado em

NaOH 8 mM. A quantificação do DNA foi feita a 260 nm, e uma unidade (1,0) obtida neste comprimento de onda corresponde a 50 µg/ml de DNA de fita dupla.

3.3.2 Amplificação dos fragmentos gênicos por PCR “Polymerase Chain Reaction”

O fragmento gênico da aprotinina foi amplificado utilizando a reação da polimerase em cadeia (PCR). Os oligonucleotídeos foram sintetizados a partir da sequência da aprotinina bovina (KASSEL 1970; KINGSTON e ANDERSON, 1986). A sequência do oligonucleotídeo “forward” foi 5`-CGG CCT GAC TTC TGC CTA GA-3` e a sequência do oligonucleotídeo “reverse” foi 5`-AGC ACC ACC ACA GGT CCT CA-3`.

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25 µl sendo: 1 µL de DNA (100 ng/µL), 0,5 µL de enzima Taq polimerase (5 unidades/µl Invitrogen), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,5 µl de cada oligonucleotídeo específico “forward” e “reverse” na concentração de 10 pmols/µl, 2,5 µl de tampão da enzima (dez vezes concentrado), 1,0 µl MgCl₂ (50 mM) e 7,0 µL de água ultrapurificada. Essas reações foram realizadas em um aparelho termociclador de PCR (Perkin-Elmer®), seguindo o programa de amplificação de: desnaturação inicial (94 °C durante 5 minutos) seguido de 35 ciclos compostos por desnaturação (94 °C durante 50 segundos), anelamento do oligonucleotídeo (60 °C durante 50 segundos) e extensão (72 °C durante 30 segundos); finalizando a 72 °C por 7 minutos.

3.3.3 Identificação e purificação dos produtos de PCR

O produto amplificado pela PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% com adição de Brometo de etídio 0,5 µg/mL. Para isto, 20 µL do produto final da PCR foram aplicados no gel de agarose. O DNA genômico extraído de pulmão bovino e suíno (5 µL) e o padrão de massa molecular, 100 pb “Ladder” (Invitrogen) foram aplicados no gel. Após a

realização da eletroforese o gel foi colocado em um transiluminador de luz Ultra Violeta (UV) acoplado a um sistema de captura de imagem.

O fragmento obtido pela PCR, 174 pb, foi purificado utilizando o Kit de extração “Pure Link Quick Gel Extraction” (Invitrogen Life Technologies) segundo as instruções do fabricante.

3.3.4 Clonagem

As bandas amplificadas através de PCR do DNA genômico bovino e do DNA genômico suíno e isoladas do gel foram ligadas ao vetor pGEMT-Easy (Promega) utilizando a enzima T4 DNA Ligase.

A reação de ligação foi feita para um volume final de 10 µl sendo: 50 ng de vetor e quantidade de fragmento de DNA purificado suficiente para fornecer uma relação de 1:3 mols de terminações do vetor e inserto respectivamente, 2 µl de tampão da enzima T4 DNA ligase, 1 µl de T4 DNA ligase (400 U/mL), a 4 °C por 16 horas. Decorrido às 16 horas, a mistura de ligação foi usada na transformação da linhagem *E.coli* DH5α por CaCl₂. As preparações de bactérias competentes foram feitas segundo protocolo descrito em Sambrook et al. (1989) e armazenadas a -70 °C, em alíquotas de 50 µl, até o momento do uso.

Para a transformação, as bactérias competentes foram mantidas em banho de gelo por aproximadamente 15 minutos. Após este tempo, 5 µl da reação de ligação foram adicionados a uma alíquota de bactéria competente descongelada e o tubo contendo a mistura foi mantido em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, um choque térmico por 2 minutos a 42 °C foi realizado. Os tubos foram colocados, novamente, no banho de gelo por 5 minutos. Decorrido este tempo, 900 µl de meio SOC (2% bacto-triptona, extrato de levedo 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 20 mM e glicose 20 mM) previamente aquecido foram adicionados e a incubação foi realizada por 90 minutos a 37 °C, com agitação. A cultura foi plaqueada em meio LB-ágar contendo 100 µg/µl de ampicilina, IPTG 0,5 mM e 80 µg de X-Gal e incubada a 37 °C por 18 horas. Após este tempo, a colônia contendo o plasmídeo foi retirada da placa e transferida para 8 mL de meio contendo ampicilina. A cultura foi incubada a 37 °C “overnight”, a

seguir foi retirado 5 mL deste meio e o plasmídeo purificado utilizando o kit PureLink – Plasmid miniprep (Invitrogen).

3.3.5 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento dos produtos de PCR foi feito segundo o método de Sanger et al. (1992), utilizando o seqüenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer da Applied Biosystems (Hitachi) e os oligonucleotídeos M13 - “forward” (5’-TTTCCCAGTCACGA-3’) e M13 “reverse” (5’-CAGGAAACAGCTATGAC-3’). A reação de sequenciamento foi realizada num volume final de 10 µl sendo: DNA molde 500 ng, oligonucleotídeo 1,6 pmols, Tris-HCl 60 mM pH 9,0, MgCl₂ 1,5 mM; 1 µl da mistura de reação fornecida pelo fabricante (ABI PRISM[®] BigDye[®] terminator v3.1 Applied Biosystems) que contém ddNTPs marcados com corantes fluorescentes específicos, deoxidinucléotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dUTP) e AmpliTaq DNA polimerase. O programa utilizado foi constituído de 40 ciclos: a) 94 °C por 10 segundos; b) 52 °C por 20 segundos; c) 60 °C por 4 minutos em aparelho termociclador de PCR (*GeneAmp*). O produto foi seqüenciado em um seqüenciador de DNA automatizado Prism 377 (Applied Biosystems).

3.3.6 Análise das seqüências

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas com a seqüência de nucleotídeos da aprotinina bovina (KASSELL 1970; ANDERSON e KINGSTON, 1983) utilizando os programas “online” NCBI Blast e “multiple sequence alignment tools” disponíveis no “site” do NCBI “National Center for Biotechnology Information”. O programa “Translate tool” disponível “on line” no “site” ExPASy “Expert Protein Analysis System” foi utilizado para obter a seqüência predita de aminoácidos. A seqüência predita de aminoácidos da aprotinina suína foi

alinhada com a sequência de aminoácidos da aprotinina bovina utilizando o programa Clustal W (HIGGINS et al., 1994) disponível no “site” EMBI “European Bioinformatics Institute”.

3.4 Extração e isolamento do inibidor ácido estável de pulmão suíno

A extração dos inibidores foi feita de acordo com a metodologia descrita por Kassell (1970). Os pulmões suínos foram triturados em um liquidificador industrial (Waring commercial blender) com tampão Trietanolamina-HCl 0,1 M pH 7,8 acrescido de NaCl 0,3 M, CaCl₂ 0,01 M e PMSF 0,6 mM. Para cada 1 kg de pulmão triturado, 1,5 L ou 1,0 L do tampão acima foi utilizado. O material foi mantido a 4 °C por 1 hora sob agitação. Após o término da agitação o material foi filtrado a vácuo. E ao filtrado foi adicionado derivado de celulose 30% (m/v), a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 11000 g, 4 °C por 1 hora. Após a centrifugação o pellet foi descartado, e ao sobrenadante foi adicionado ácido tricloroacético 50% (m/v), a mistura foi mantida em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. Duas diferentes concentrações de ácido tricloroacético 50% (m/v) foram utilizadas; 1,25% e 2,5% (v/v). Decorrido os trinta minutos, o material ácido insolúvel foi removido por centrifugação a 11000 g, 4 °C por 1 hora. O “pellet” foi novamente descartado e o pH do sobrenadante foi ajustado para 7,8 com NaOH 1,0 M. Os sobrenadantes da precipitação ácida pH 7,8 foram denominados: SPA 1 e SPA 2 quando utilizados 1,25% e 2,5% de ácido tricloroacético, respectivamente. Estes sobrenadantes foram caracterizados quanto à inibição de tripsina e utilizados nos procedimentos de purificação.

3.5 Ultrafiltração tangencial

O SPA 2 foi concentrado utilizando membrana Pellicon XL Millipore PLCKM celulose regenerada de corte nominal de 10 kDa e área de filtração de 50 cm² acoplada a um sistema Labscale-TFF® (Millipore), com capacidade de fluxo de 10 a 100 mL / minuto e pressão de trabalho a 60 psi. As membranas foram lavadas com água purificada e a seguir com tampão

Trietanolamina-HCl 0,1 M pH 7,8 acrescido de CaCl₂ 10 mM. A filtração foi realizada a 30 psi, 2,1 bar e 1,5 mL/minuto. O concentrado e filtrado de 10 kDa obtidos foram armazenados a -20 °C.

Também, foi utilizado o sistema QuixStand Benchtop System® (GE Healthcare) com cartucho de fibra oca “Hollow fiber cartridge” (GE Healthcare) com corte nominal de 100 e 3 kDa e área de filtração de 14000 cm². As amostras foram concentradas a 250 rpm sob 10 e 5 psi para a pressão de entrada e saída, respectivamente. O SPA 2 foi concentrado no cartucho de 100 kDa. O concentrado de 100 kDa foi armazenado a -20 °C, e o filtrado de 100 kDa foi concentrado no cartucho de 3 kDa. Os concentrados de 100 e 3 kDa foram submetidos à troca de tampão. O volume de tampão utilizado neste processo foi 5 vezes maior que o volume da amostra e a velocidade de alimentação foi igual à velocidade de obtenção do filtrado.

3.6 Cromatografia

3.6.1 Cromatografia de afinidade tripsina-agarose (1ª condição cromatográfica)

Um ou dois mililitros de resina tripsina-agarose (Sigma T-1763 - 19,5 unidades / mL de gel) foram empacotados, manualmente, em uma seringa. Anteriormente à etapa de adsorção, a coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,8 contendo NaCl 250 mM. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão descrito acima. Finalmente, as proteínas adsorvidas foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. Após a eluição, o pH das frações foi ajustado para 7,8 com NaOH 1 M. As frações eluídas foram analisadas quanto à concentração de proteínas, inibição de tripsina e grau de pureza.

3.6.2 Cromatografia de afinidade tripsina-Sepharose (2ª condição cromatográfica)

O procedimento utilizado para a imobilização de tripsina na resina Sepharose foi o recomendado pelo fabricante da resina. Um grama de resina Sepharose 4B CNBR® ativada (Ge

Healthcare) foi ressuspendido e lavado com 200 mL de HCl 1 mM durante 10 minutos. Para cada mL de gel foram utilizadas 6 mg de tripsina (Sigma T-0134 - 15.100 units/mg de proteína) diluídas em tampão NaHCO_3 0,1 M pH 8,3, acrescido de NaCl 0,5 M e benzamidina 0,1 M 10 % (V/V). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas e após este tempo, foi mantida em repouso a 4 °C “overnight”. Após este período, a resina foi lavada com tampão NaHCO_3 0,1 M pH 8,3 acrescido de NaCl 0,5 M e a seguir mantida em repouso a temperatura ambiente por duas horas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Decorrido este tempo, a resina foi lavada com 3 ciclos alternados de pH 4,0 (tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M) e pH 8,0 (tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M) cada.

A resina de afinidade tripsina-Sepharose foi empacotada em uma coluna XK 16 (16 x 200 mm Ge Healthcare), para um volume de 9,0 ou 8,0 mL. Anterior a etapa de adsorção, a coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (tampão de equilíbrio). A amostra foi aplicada, e posteriormente a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 acrescido de 150 mM de NaCl ou Tris-HCl 50 mM pH 8,0 acrescido 300 mM de NaCl. Uma segunda lavagem foi feita utilizando o tampão de equilíbrio. As frações foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. O pH das frações foi ajustado para 7,8 com NaOH 1 M. As amostras foram analisadas quanto à concentração de proteínas e inibição de tripsina e grau de pureza.

3.6.3 Associação de cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade (3ª Condição cromatográfica)

O SPA 2 suíno foi aplicado na coluna HiPrep™ “desalting” 26/10 (Ge Healthcare) acoplada ao sistema cromatográfico RedFrac (GeHealthcare). O tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 50 mM foi utilizado na cromatografia de filtração em gel. A coluna foi equilibrada e eluída com o tampão descrito acima a um fluxo 5,0 mL/minuto. Os picos registrados foram coletados manualmente e analisados quanto à concentração de proteína e inibição de tripsina. Os picos ativos foram utilizados na cromatografia de troca-iônica. A cromatografia de troca-iônica utilizou a coluna HiTrap® SP-Sepharose® e Q-Sepharose® (5 mL) conectadas em série (SP e Q) e acopladas ao sistema cromatográfico RedFrac (GeHealthcare). As

colunas foram equilibradas com o tampão descrito acima e carregadas com o “pool” de picos ativos. O fluxo nestas etapas foi de 5 mL/min. A seguir as colunas foram desconectadas e lavadas. A eluição foi feita com o mesmo tampão descrito acima acrescido de NaCl 0,30 M e 1,0 M a 2 mL/min. A concentração de proteína e inibição de tripsina das frações eluídas de ambas as colunas foram determinadas. As frações ativas foram aplicadas, separadamente e manualmente, na coluna tripsina-agarose (3 mL). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,8 acrescido de NaCl 0,25 M. As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. Após a eluição, o pH das frações foi ajustado para 7,8. E as frações foram analisadas quanto à concentração de proteínas, inibição de tripsina e grau de pureza.

3.6.4 Cromatografia de afinidade Heparina-Sepharose (4ª Condição cromatográfica)

A coluna de afinidade HiTrap® Heparin-HP foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,8 e carregada com a amostra. A seguir a coluna foi lavada com o tampão descrito acima. As proteínas adsorvidas foram eluídas com fosfato de sódio 5 mM pH 7,8 acrescido de seis diferentes concentrações de NaCl: 150, 250, 500, 750, 1000 e 1500 mM, respectivamente. Todo o procedimento foi manual, e para cada concentração de sal utilizada foram coletadas duas frações de 1,5 mL, cada. As frações foram analisadas quanto à concentração de proteínas e inibição de tripsina.

3.7 Sequenciamento do N-terminal

Inicialmente, a fração da condição cromatográfica contendo o suposto inibidor foi purificada utilizando a cromatografia de fase reversa acoplada ao sistema HPLC (Shimadzu LC-20AT). A coluna C-18 (Sephasil Peptide-Pharmacia 4,6 mm x 250 mm) foi carregada com 230 µg da fração em estudo. Um gradiente linear de solvente A (ácido trifluoroacético TFA 0,1% em água) e solvente B (acetonitrila 90% v/v + 10% v/v do solvente A) foi utilizado. O gradiente foi

estabelecido entre 5 e 80% do solvente B em 50 minutos. Os picos foram eluídos a 0,5 mL/min, e coletados manualmente de acordo com a densidade óptica a 214 nm.

O sequenciamento do N-terminal foi determinado pela degradação de Edman usando o Protein Sequencer (PPSQ-21) (Shimadzu).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Extração de inibidores protéicos de serinoproteases de pulmão suíno tipo aprotinina

Os pulmões suínos, doados pela Sadia, foram usados para extração da aprotinina utilizando a metodologia descrita por Kassell (1970) para isolar a aprotinina de pulmão bovino. Esta metodologia é utilizada para o isolamento de inibidores básicos, resistentes a ácido, a partir de órgãos de animais ruminantes como; boi, carneiro e alce (FIORETTI et al., 1983; FIORETTI et al., 1990; ELEUTERI et al., 1994). Neste protocolo o extrato bruto é clarificado por elemento filtrante associado à centrifugação para remoção de material particulado, células, organelas e “debris” seguido de precipitação por desnaturação ácida para remoção de proteínas indesejáveis (contaminantes) ainda presentes no sobrenadante. A alteração de pH preserva solúvel o inibidor básico que é recuperado no sobrenadante. A extração de inibidor básico de baixa massa molecular de pulmão suíno foi feita conforme descrito acima (Figura 4.1.1). Ao clarificado foi adicionado ácido tricloroacético em duas diferentes concentrações 1,25% ou 2,5%. Estes clarificados foram denominados SPA 1 e SPA 2, respectivamente. A caracterização de SPA 1 e SPA 2 quanto à inibição de tripsina e concentração de proteína está descrita na tabela 4.1.1.

Figura 4.1.1 – Fluxograma da extração do inibidor ácido resistente a partir de pulmão suíno. Os pulmões suínos foram triturados e extraídos com tampão Trietanolamina-HCl 0,1 M pH 7,8 + NaCl 0,3 M + CaCl₂ 0,01 M e PMSF 0,6 mM . Após 2 horas de agitação o material sólido foi removido por filtração a vácuo. Trinta % de derivado de celulose foram adicionados ao filtrado, e a mistura foi centrifugada a 11000 g, 4 °C durante 1 hora. Ao sobrenadante foi adicionado ácido tricloroacético 50% (1,25% ou 2,5%), esta mistura foi mantida durante 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o precipitado foi removido por centrifugação a 11000 g, 4° C e 60 minutos. O sobrenadante obtido teve seu pH ajustado para 7,8 com NaOH 1,0 M e foi denominado SPA 1 (sobrenadante obtido da precipitação ácida com 1,25% TCA) ou SPA 2 (sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA).

Em razão da alta vascularização do pulmão as proteínas do sangue são extraídas junto com as proteínas deste órgão. Dessa forma, o extrato bruto e o clarificado pulmonar apresentam algumas proteínas sanguíneas como: albumina e cadeias de hemoglobina. Grande parte destas proteínas foi removida durante a precipitação ácida. Aproximadamente 90,15% e 95,35% da proteína total presente no clarificado foram precipitadas com a utilização de 1,25% e 2,5% de ácido tricloroacético (Tabela 4.1.1).

Tabela 4.1.1 – Concentração de proteína e inibição de tripsina do SPA 1 e do SPA 2. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	pH	Proteína (mg/mL) (BCA)	Proteína precipitada (%)	AIE (UI/µg)
Clarificado	7,8	14,50	0	nd
SPA 1	1,5	1,43	90,15	0,0043
SPA 2	1,0	0,67	95,35	0,0032

SPA 1 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 1,25% TCA

SPA 2 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA

AIE = Atividade inibitória específica

nd = não determinado

Os perfis eletroforéticos destas amostras (Figura 4.1.2) mostram que as proteínas de massa molar ao redor de 60, 30 e 14 kDa foram precipitadas pelo ácido tricloroacético (Figura 4.1.2 A, poço 3, Figura 4.1.2 B, poço 3 e Figura 4.1.2 C, poço 2). As bandas de baixas massas moleculares foram majoritárias no SPA 2 (Figura 4.1.2 C, poço 2). SPA 1 apresentou também 3 bandas de massas molares ao redor de 66 kDa (Figura 4.1.2 B, poço 3), enquanto SPA 2 apresentou apenas uma banda abaixo de 66 kDa (Figura 4.1.2 C, poço 2) que foi correlacionada ao inibidor de alta massa molecular observado na zimografia reversa das duas amostras (4.1.2 D). A banda de 66 kDa (provavelmente albumina) especialmente presente em SPA 1 foi reduzida com a utilização de 2,5% de ácido tricloroacético (Figura 4.1.2 C, poço 2).

Figura 4.1.2 – Caracterização dos sobrenadantes da precipitação ácida (SPA 1 e SPA 2) - **A, B e C** - **SDS-PAGE 15%**. Perfis eletroforéticos das amostras durante o processo de extração. Os pulmões suínos foram triturados e extraídos com tampão Trietanolamina-HCl 0,1 M pH 7,8 + NaCl 0,3 M + CaCl₂ 0,01 M e PMSF 0,6 mM 1 hora sob agitação. Após este tempo o material foi filtrado a vácuo, e ao filtrado foi adicionado 30% de derivado de celulose. Esta mistura foi centrifugada a 11000 g, 4 °C durante 1 hora. Ao sobrenadante foram adicionados 1,25% ou 2,5% de ácido tricloroacético 50% (m/v) e mantido em repouso durante 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o sobrenadante da precipitação ácida foi obtido a partir de uma nova centrifugação a 11000 g, 4 °C durante 1 hora. As amostras contendo 30 µg de proteína total foram aplicadas no gel, sob condições redutoras. **A - Poço 1:** padrão de massa molar. **Poço 2:** clarificado. **B - Poço 1:** albumina. **Poço 2:** padrão de massa molar. **Poço 3:** SPA 1 (sobrenadante obtido da precipitação ácida com 1,25% de TCA). **C - Poço 1:** padrão de massa molar. **Poço 2:** SPA 2 (sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% de TCA). **D - Zimografia Reversa.** As amostras foram aplicadas, sob condições não redutoras, no gel de SDS-PAGE (15%) contendo gelatina copolimerizada. Após eletroforese, o gel foi incubado por 8 horas com tampão Tris-HCl contendo tripsina, e corado com “coomassie blue”. **Poço 1:** soybean (5 µg). **Poço 2:** SPA 1 (90 µg). **Poço 3:** SPA 2 (15 µg). **Poço 4:** SPA 2 (90 µg).

As atividades específicas para inibir tripsina de SPA 1 e de SPA 2 foram determinadas considerando-se unidades de inibição por µg de proteína total (Tabela 4.1.1). Um (1 µg) micrograma de proteína total do SPA 1 e SPA 2 inibiu de 3,0-4,0 ng de tripsina. Isto de certa forma é esperado pelo baixo grau de pureza das amostras obtidas a partir deste passo de purificação (Figura 4.1.2 B, poço 3 e Figura 4.1.2 C, poço 2). As inibições de tripsina do extrato pulmonar bruto e do clarificado não foram determinadas devido à cor vermelha intensa destas amostras que interfere no ensaio colorimétrico utilizado neste trabalho.

Os sobrenadantes SPA 1 e SPA 2 ainda que pouco ativos para inibir tripsina (Tabela 4.1.1) continuaram sendo processados, pois os resultados da zimografia reversa destas amostras comprovaram a presença de inibidores resistentes a ácido (Figura 4.1.2 D, poços 2, 3 e 4). A zimografia reversa é uma técnica efetiva para isolamento e caracterização de inibidores naturais de proteinases (LÊ e KATUNUNA, 2004) detectando inclusive a atividade individual de uma proteína (SMITH et al., 2004).

Os sobrenadantes SPA 1 e o SPA 2 foram utilizados como amostras para as etapas seguintes da purificação de inibidores de serinoproteases.

4.2 Purificação da aprotinina suína

Neste item, são apresentados os resultados dos estudos de purificação cromatográfica da aprotinina suína a partir do SPA 2 (sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA). Para a purificação da aprotinina suína, alguns experimentos foram feitos utilizando apenas a cromatografia de afinidade enquanto outros utilizaram três passos cromatográficos; gel filtração, troca-iônica (resina SP-Sepharose e Q-Sepharose, conectadas em série) e afinidade (tripsina-agarose). Os perfis eletroforéticos das frações com atividade inibitória para tripsina, a sua caracterização pela zimografia reversa e caracterização imunoenzimática, bem como a concentração de proteína, inibição de tripsina e fator de purificação foram apresentados. Além disso, a sequência do fragmento genômico e a sequência predita de aminoácidos da aprotinina suína foram também determinadas e apresentadas.

4.2.1 Cromatografia de afinidade utilizando o SPA 2

O SPA 2 foi utilizado para carregar a coluna de tripsina-agarose (1,0 mL). As proteínas adsorvidas foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0 (Figura 4.2.1.1).

Figura 4.2.1.1 – Fluxograma da purificação do inibidor suíno ácido resistente. O SPA 2 (Sobrenadante da precipitação ácida com 2,5% TCA) foi injetado na coluna tripsina-agarose (1 mL) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 acrescido de NaCl 0,25 M. As frações foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0, e imediatamente após a eluição o pH das frações foi ajustado para 7,8 com NaOH 1,0 M.

A recuperação protéica das frações eluídas da coluna correspondeu a 0,49% da proteína total injetada e a recuperação da inibição de tripsina destas amostras foi de 69,94% (Tabela 4.2.1.1). As inibições de tripsina no “flow through” e no lavado não foram detectadas.

Tabela 4.2.1.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da tripsina-agarose carregada com o SPA 2. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (µg)	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação**
SPA 2	9,0	7200	0,0032	23,06	100	100	1
“Flow-through”	9,0	6300	0	0	87,5	0	0
Lavado	15,0	810	0	0	11,25	0	0
Fração 1	1,5	12,45	0,41	5,08	0,17	22,06	127,69
Fração 2	1,5	23,4	0,46	10,74	0,32	46,59	143,75
Fração 3	1,5	7,5	0	0	0,104	0	0

Nove mililitros do SPA 2 (7,2 mg) foram aplicados na tripsina-agarose (1,0 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 acrescido de NaCl 0,25 M. As frações (1,5 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0.

SPA2 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA

AIE = Atividade inibitória específica

AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

O “flow-through”, o lavado e as frações eluídas da cromatografia de afinidade (tripsina-agarose) foram analisados por SDS-PAGE e os resultados apresentados na figura 4.2.1.2. O “flow-through” apesar de apresentar banda abaixo de 14 kDa semelhante à observada na amostra inicial, não apresentou atividade inibitória. As frações 1 e 2 ativas para inibir tripsina apresentaram bandas de 50, 40, 35, 27, 17 e 14 kDa (Figura 4.2.1.2, poços 6 e 7). Banda de massa molar característica da aprotinina (6,5 kDa) não foi observada nestas frações. A inibição de tripsina verificada no SPA 2 indica a presença de inibidor (es) de serinoproteases em pequenas concentrações e não ainda possível de correlacioná-los com a aprotinina, fato inclusive comprovado, pela zimografia reversa (Tabela 4.2.1.1, Figura 4.1.2 D, poço 3 e 4). Apesar da cromatografia de afinidade ser um método eficiente de separação, inclusive quando a proteína de interesse é o componente minoritário da mistura (JANSON e RYDEN, 1989), as frações da cromatografia de afinidade tripsina-agarose não apresentaram suficiente grau de pureza para detecção do inibidor esperado.

Figura 4.2.1.2 – SDS-PAGE 15%. Análise eletroforética das frações eluídas da cromatografia de afinidade (tripsina-agarose) a partir do SPA 2. O SPA 2 foi aplicado na coluna tripsina-agarose (1 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 acrescido de NaCl 0,25 M. As frações (1,5 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. As amostras contendo 10 µg de proteína total foram aplicadas no gel, sob condições redutoras. **Poço 1:** BSA. **Poço 2:** padrão de massa molar. **Poço 3:** SPA 2. **Poço 4:** “flow-through”. **Poço 5:** lavado. **Poço 6:** fração 1. **Poço 7:** fração 2

Como o objetivo deste trabalho foi purificar um inibidor do tipo aprotinina de massa molar de 6,5 kDa, a partir de pulmão suíno, a ultrafiltração tangencial utilizando membrana de celulose regenerada de 10 kDa foi introduzida como uma etapa anterior à cromatografia de afinidade com o objetivo de eliminar os inibidores de alta massa molar (neste caso, os inibidores maiores que 30 kDa). Os resultados obtidos utilizando a ultrafiltração tangencial são descritos no próximo item.

4.2.2 Cromatografia de afinidade (tripsina-Sepharose) do filtrado de 10 kDa

A ultrafiltração tangencial, visou à eliminação das proteínas maiores que 30 kDa inclusive os inibidores de alta massa molar presentes no SPA 2 (Figura 4.1.2 D, poços 3 e 4). Membranas de celulose regenerada de corte nominal de 10 kDa foram utilizadas neste procedimento.

O concentrado de 10 kDa apresentou 26,66% da proteína total, e 59,25% da inibição inicial de tripsina. Já o filtrado de 10 kDa apresentou 79,45% da proteína total e 44,14% da inibição inicial de tripsina. O concentrado de 10 kDa apresentou atividade específica para inibir tripsina 4 vezes maior que o filtrado de 10 kDa (Tabela 4.2.2.1). Estas amostras foram analisadas em SDS-PAGE, e os resultados foram apresentados na figura 4.2.2.1. O concentrado de 10 kDa apresentou perfil eletroforético idêntico ao do SPA 2 (Figura 4.2.2.1, poços 3 e 4) e o filtrado de 10 kDa, bandas abaixo de 30 kDa (Figura 4.2.2.1, poço 5). Sob condições não redutoras, uma banda ao redor de 17 kDa presente em todas as amostras desapareceu e uma banda ao redor de 22 kDa foi visualizada (Figura 4.2.2.1, poços 7, 8 e 9). Dentre as três amostras o concentrado de 10 kDa apresentou melhor atividade inibitória para tripsina, sendo justificado pela presença de inibidores de tripsina maiores e menores que 30 kDa. Como o filtrado de 10 kDa apresentou apenas bandas menores que 30 kDa (Figura 4.2.2.1, poço 5 e 9) e também inibiu tripsina, foi utilizado para purificar o inibidor ácido estável de baixa massa molecular (Tabela 4.2.2.1 e Figura 4.2.2.2).

Tabela 4.2.2.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina do concentrado e do filtrado de 10 kDa. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total µg	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação**
SPA 2	1000	693750	0,0045	3121,87	100	100	1
Concentrado 10 kDa	100	185000	0,010	1850	26,66	59,25	2,22
Filtrado 10kDa	900	551250	0,0025	1378,12	79,45	44,14	0,55

SPA2 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA

AIE = Atividade inibitória específica

AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

Figura 4.2.2.1 – SDS-PAGE 15%. Análise eletroforética do concentrado e filtrado de 10 kDa. O SPA 2 foi submetido a ultrafiltração tangencial utilizando membrana de celulose regenerada de 10 kDa. As amostras contendo 30 µg de proteína total foram aplicadas no gel, sob condições redutoras (canaletas 3 a 5) e condições não redutoras (canaletas 7 a 9). **Poço 1:** BSA. **Poço 2:** padrão de massa molar. **Poço 3:** SPA 2. **Poço 4:** concentrado 10 kDa. **Poço 5:** filtrado 10 kDa. **Poço 6:** vazio. **Poço 7:** SPA 2. **Poço 8:** concentrado 10 kDa. **Poço 9:** filtrado 10 kDa.

Figura 4.2.2.2 – Fluxograma da purificação do inibidor suíno ácido resistente a partir do filtrado de 10 kDa. O SPA 2 (Sobrenadante da precipitação ácida com 2,5% TCA) foi submetido a ultrafiltração tangencial utilizando membrana de 10 kDa. O filtrado de 10 kDa foi aplicado na coluna tripsina-Sepharose (9,0 mL) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. As frações foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0, imediatamente após a eluição o pH das frações foi ajustado para 7,8 com NaOH 1,0 M.

As frações eluídas com HCl 10 mM pH 2,0 da coluna tripsina-Sepharose (9,0 mL) carregada com o filtrado de 10 kDa foram analisadas quanto à concentração total de proteína e inibição de tripsina (Tabela 4.2.2.2).

A atividade específica de inibição de tripsina detectada apenas na fração 4 foi de 0,95 correspondendo a um fator de purificação de 380 (Tabela 4.2.2.2). A recuperação de proteína desta fração foi 0,18% e a recuperação da atividade inibitória foi de 69,21% (Tabela 4.2.2.2). O “flow-through” foi coletado em alíquotas de 40 mL cada. A atividade específica de inibição da tripsina foi detectada a partir do segundo “flow through” (Tabela 4.2.2.2). As recuperações de proteína e da atividade específica de inibição de tripsina do segundo lavado foram de 0,98 e 16,04%, respectivamente (Tabela 4.2.2.2). Provavelmente, o volume da amostra inicial (160 mL) e o fluxo utilizado durante a cromatografia (3 mL/min) diminuíram a eficiência da cromatografia.

Tabela 4.2.2.2 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da tripsina-Sepharose carregada com o filtrado de 10 kDa. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total µg	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação**
Filtrado de 10kDa	160	98000	0,0025	245	100	100	1
1 “flow-through”	40	14120	0	0	14,41	0	0
2 “flow-through”	40	21520	0,0014	30,13	21,96	12,30	—
3 “flow-through”	40	23417,6	0,0013	30,44	23,89	12,42	—
4 “flow-through”	40	23219,2	0,0010	23,22	23,69	9,48	—
Lavado 1	80	12952	0	0	13,22	0	0
Lavado 2	45	958,95	0,041	39,31	0,98	16,04	16,4
Fração 4	9,00	177,75	0,95	169,57	0,18	69,21	380

Cento e sessenta mililitros do filtrado 10 kDa (98 mg) obtidos a partir do SPA 2 foram aplicados na tripsina-Sepharose (9,0 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 acrescido de 0,15 M de NaCl e Tris-HCl 50 mM pH 8,0, respectivamente. As frações (9,0 mL) foram eluídas com HCL 10 mM pH 2,0. O fluxo de 3 mL/min foi utilizado durante as etapas de adsorção, lavagem e eluição.

AIE = Atividade inibitória específica

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

Tabela 4.2.2.3 – Rendimento estimativo da purificação do inibidor suíno ácido resistente a partir do filtrado de 10 kDa. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando o BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (µg)	AIE (UI/µg)	AIE total	Recuperação da proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação**
SPA 2	1500	1040625	0,0045	4682,81	100	100	1
Filtrado 10kDa	1350	826875	0,0025	2067,1875	79,45	44,14	0,55
Fração ativa	75,94	1499,76	0,95	1424,77	0,00144	30,42	211,11

Os cálculos foram feitos a partir dos dados apresentados nas tabelas 4.2.2.1 e 4.2.2.2, considerando que 1500 ml de SPA 2 são obtidos a partir de 1 kg de pulmão suíno.

SPA2 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA

AIE = Atividade inibitória específica

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

Os dados das tabelas 4.2.2.1 e 4.2.2.2 permitiram inferir que de 1 kg de pulmão suíno podem ser obtidos 1,5 mg de proteína total com atividade específica de 0,95 (fração 4) para inibir tripsina (Tabela 4.2.2.3). A fração 4 (Tabela 4.2.2.2) apresentou atividade específica para inibir

tripsina maior que as frações eluídas da cromatografia de afinidade carregada com o SPA 2 (Tabela 4.2.1.1). As caracterizações eletroforética e imunoenzimática desta fração foram apresentadas na figura 4.2.2.3.

Os perfis eletroforéticos dos “flow-throughs” foram semelhantes ao perfil eletroforético do filtrado de 10 kDa (Figura 4.2.2.3 A, poços 2 a 5). A fração 4 apresentou quatro bandas distintas: 27, 20, 17 e 14 kDa e um “smear” abaixo de 14 kDa (Figura 4.2.2.3 A, poço 9). Novamente, a banda de massa molecular característica da aprotinina não foi observada nesta fração. No zimograma reverso, a fração 4 apresentou uma banda ao redor de 20 kDa com atividade inibitória para tripsina (Figura 4.2.2.3 C, poço 5 e 6). Apesar de apresentarem massas moleculares diferentes, os inibidores comerciais soybean (20 kDa) e aprotinina bovina (6,5 kDa) apresentaram migração eletroforética semelhante na zimografia reversa (Figura 4.2.2.3 C, poços 3, 4 e 7). Schagger e Jagow (1987) mostraram que o SDS presente no tampão tris-glicina complexa com as proteínas de baixa massa molecular afetando sua migração e resolução. Le e Katunuma (2004) resolveram este problema da zimografia reversa de peptídeos e de pequenas proteínas trocando o carregador do íon do tampão por tricina. A análise das bandas, com atividade inibitória para tripsina, detectadas na zimografia reversa mostrou que dentre os três inibidores comerciais, a aprotinina apresentou maior área de inibição para uma mesma concentração (Figura 4.2.2.3 C, poços 1, 4 e 7). A menor atividade do α_1 -AT pode ser relacionada à clivagem do seu sítio ativo ao interagir com a proteinase (MOREAU et al., 2008). A relação estequiométrica dos complexos aprotinina-tripsina e soybean-tripsina são de 1:1 (LASKOWSKI e KATO, 1980). Ao considerarmos as massas moleculares da aprotinina e do soybean, o maior número de moléculas de aprotinina em 1 μ g de proteína total explicaria a área maior de inibição de tripsina na zimografia reversa pela aprotinina (Figura 4.2.2.3 C, poços 3 e 4). Outra observação foi que 15 μ g de proteína total da fração 4 corresponderam a uma área de inibição semelhante a 2 μ g de aprotinina. Em vista destes resultados, na fração ativa eluída da tripsina-Sepharose a partir do filtrado de 10 kDa há um inibidor com migração eletroforética semelhante ao soybean e ou aprotinina.

Com o objetivo de identificar o inibidor presente nesta fração foi feito o “western-blot” utilizando o soro policlonal anti aprotinina bovina. Nenhuma banda de massa molecular característica da aprotinina foi reconhecida por este anticorpo na fração 4 (Figura 4.2.2.3 B, poço 4), como as reconhecidas por ele na aprotinina bovina comercial (formas monomérica e dimérica)

(Figura 4.2.2.3 B, poço 3). Entretanto, um inibidor ácido estável de pulmão suíno e de massa molecular ao redor de 20 kDa foi detectado e caracterizado como não sendo aprotinina.

Figura 4.2.2.3 – Caracterização das frações eluídas da cromatografia tripsina-Sepharose a partir do filtrado de 10 kDa. Cento e sessenta mililitros do filtrado 10 kDa (98 mg) foram aplicados na tripsina-Sepharose (9,0 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada e as frações (9,0 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. **A – SDS-PAGE (15%).** As amostras contendo 10 µg de proteína total foram aplicadas no gel, sob condições redutoras. **Poço 1:** padrão de massa molar. **Poço 2:** filtrado de 10 kDa. **Poço 3:** “flow-through” 1. **4:** “pool” dos “flow-throughs” 2 e 3. **5:** “flow-through” 4. **Poço 6:** lavado 1. **Poço 7 e 8:** vazio. **Poço 9:** fração 4. **Poço 10:** BSA. **B – “Western Blot”.** As amostras contendo 7 µg de proteína total foram aplicadas no gel SDS-PAGE (15%) sob condições redutoras. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, que foi incubada com anticorpo policlonal contra aprotinina bovina e revelada com DAB. **Poço 1:** soybean. **Poço 2:** α_1 -AT. **Poço 3:** aprotinina bovina. **Poço 4:** fração 4. **C – Zimografia Reversa.** As amostras foram aplicadas, sob condições não redutoras, no gel de SDS-PAGE (15%) contendo gelatina copolimerizada. Após eletroforese, o gel foi incubado com tampão Tris-HCl contendo tripsina por 2 horas, e corado com “coomassie blue”. **Poço 1 e 2:** α_1 -AT (1 µg). **Poço 3:** soybean (1 µg). **Poço 4:** aprotinina bovina (1 µg). **Poço 5:** fração 4 (1µg). **Poço 6:** fração 4 (15 µg). **Poço 7:** aprotinina bovina (2 µg).

Diante dos resultados obtidos surgiram algumas questões. Seria a aprotinina restrita aos ruminantes como relatado por Laskowski e Kato (1980). Os poucos trabalhos sobre seu isolamento e purificação somente em outros ruminantes durante mais de seis décadas desde a sua descoberta, pareciam comprovar este relato. (FIORETTI et al., 1990; ELEUTERI et al., 1994). Ou a dificuldade de purificá-la a partir de órgãos de outros animais seria devida à sua baixa expressão nestes animais, inviabilizando sua purificação a partir destes. Ou ainda o inibidor ácido

estável purificado de pulmão suíno seria um inibidor do tipo SLPI, bikunina ou um outro inibidor ainda não descrito.

Outra tentativa de purificação pela introdução de mais um passo cromatográfico foi desenvolvida para a caracterização do inibidor ácido estável purificado de pulmão suíno.

4.2.3 Cromatografia de filtração em gel, troca-iônica e afinidade

Uma cromatografia de troca-iônica foi introduzida antes da cromatografia de afinidade (Figura 4.2.3.1). O objetivo foi concentrar os prováveis inibidores presentes no SPA 2 suíno a partir de seus diferentes pontos isoelétricos antes da cromatografia de afinidade. Yang et al. (2005) utilizaram as colunas de SP-Sepharose e Q-Sepharose, conectadas em série, para isolar a bikunina, inibidor com pI de aproximadamente 5,6, a partir de urina humana. Após a adsorção do material nas colunas, elas foram desconectadas e o material da Q-Sepharose eluído com 1 M de NaCl e posteriormente aplicado na tripsina-agarose.

Para a purificação da aprotinina suína foram realizadas adaptações ao método descrito por Yang et al. (2005). As colunas SP-Sepharose e Q-Sepharose foram conectadas em série, e após a aplicação da amostra, as colunas foram desconectadas e eluídas separadamente com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M e de NaCl 1,05 M (Figura 4.2.3.1). Estas concentrações foram escolhidas após testes preliminares de eluição com o tampão acrescido com diferentes concentrações de sal. Foi constatado que as proteínas foram eluídas das colunas apenas com as concentrações de 0,35 e 1,05 M de NaCl.

Durante a etapa de adsorção nas colunas de troca-iônica é importante que a amostra esteja em tampão com pH e força iônica similar ao tampão de equilíbrio da coluna (SCOPES, 1987). Como a força iônica de SPA 2 é maior que a força iônica do tampão de equilíbrio, uma cromatografia de filtração em gel foi utilizada para a troca de tampão da amostra.

A diafiltração não foi utilizada por que uma quantidade significativa de proteínas menores que 10 kDa passariam pela membrana durante o processo (Figura 4.2.2.1 poço 5). Assim, as trocas de tampão das amostras SPA 2 foram feitas utilizando a coluna Hi PrepTM 26/10 “desalting” (Figura 4.2.3.1).

Figura 4.2.3.1 – Fluxograma da purificação da aprotinina suína a partir do SPA 2 utilizando as cromatografias: filtração em gel, troca-iônica e afinidade. O SPA 2 (Sobrenadante da precipitação ácida com 2,5% TCA) foi aplicado na coluna “desalting” Hi Prep™ 26/10, a coluna foi eluída com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 50 mM. O “pool” do 1º pico do “desalting” foi aplicado nas colunas SP-Sepharose e Q-Sepharose, conectadas em série (5 mL cada). Após a aplicação da amostra, as colunas foram desconectadas, lavadas e eluídas, separadamente, com o tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 50 mM e com o tampão descrito acima acrescido de 0,35 e 1,05 M de NaCl, respectivamente. As frações ativas para inibir tripsina eluídas da Q-Sepharose e da SP-Sepharose com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M foram aplicadas, separadamente, na coluna tripsina-agarose. Esta coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,8 acrescido de NaCl 250 mM e eluída com HCl 10 mM pH 2,0.

Trinta e cinco corridas foram feitas. Apenas dois picos foram registrados a 280 nm, os 1ºs picos de cada corrida foram reunidos em um “pool”, e o mesmo procedimento foi adotado para o outro pico. O “pool” de cada pico foi caracterizado quanto à concentração de proteína e inibição de tripsina. Apenas o “pool” do 1º pico inibiu tripsina. A recuperação da proteína total e a recuperação da atividade específica de inibição de tripsina do “pool” do 1º pico foram de 39,86%

e 91,12%, respectivamente (Tabela 4.2.3.1). Esta amostra foi aplicada nas colunas de troca-iônica SP-Sepharose e Q-Sepharose, conectadas em série (Figura 4.2.3.1).

Tabela 4.2.3.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina durante a troca de tampão do SPA 2. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total µg	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação**
SPA 2	350	301000	0,0035	1053,5	100	100	1
“Pool” do 1º pico	450	120000	0,008	960	39,86	91,12	2,28

Dez mililitros do SPA 2 foram aplicados na coluna “desalting” 26/10 e eluídos com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 50 mM. Trinta e cinco corridas foram realizadas. O 1º pico de cada uma das 35 corridas foi reunido em um “pool”, o mesmo procedimento foi adotado para o 2º pico. Os “pools” foram analisados quanto à concentração de proteína e inibição de tripsina. Apenas o “pool” dos primeiros picos foi ativo para inibir tripsina.

SPA2 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA

AIE = Atividade inibitória específica

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

Após a aplicação do “pool” dos 1^{os} picos, as colunas SP-Sepharose e Q-Sepharose (conectadas em série) foram desconectadas, lavadas e eluídas separadamente. Com o intuito de recuperar e caracterizar os inibidores adsorvidos nas duas resinas, as duas colunas foram eluídas e não apenas a coluna SP-Sepharose onde supostamente a aprotinina estaria adsorvida.

Quando as proteínas estão em um tampão com pH acima do seu pI a sua carga líquida é negativa, e elas são adsorvidas na resina trocadora de cátions (Q-Sepharose). Quando o pH do meio é menor que o pI das proteínas a carga líquida das proteínas é positiva, e elas são adsorvidas à resina trocadora de ânions (SP-Sepharose). A aprotinina é um inibidor básico e seu pI é de aproximadamente 10,5. Nas nossas condições (pH 7,0) proteínas com pI básico ligar-se-iam à resina trocadora de cátion (SP-Sepharose).

A tabela 4.2.3.2 apresenta a concentração de proteína e a inibição de tripsina do material não adsorvido e das frações eluídas das colunas Q-Sepharose e SP-Sepharose em pH 7,0. Foi observado que 49,52% das proteínas aplicadas nas colunas Q-Sepharose e SP-Sepharose não foram adsorvidas. A resina trocadora de ânions (Q-Sepharose) adsorveu 9,71% da proteína total utilizada para carregar ambas as colunas. Oitenta e três % das proteínas adsorvidas na Q-Sepharose foram eluídas com NaCl 0,35 M correspondendo a maior recuperação de inibição de tripsina (Tabela 4.2.3.2). A coluna SP-Sepharose adsorveu 15,95% da proteína total aplicada nas

duas colunas. As proteínas eluídas com NaCl 0,35 M representaram 60,79% das proteínas adsorvidas nesta coluna correspondendo também, a maior recuperação da inibição total de tripsina (Tabela 4.2.3.2).

Tabela 4.2.3.2 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da cromatografia de troca-iônica (SP-Sepharose e Q-Sepharose, conectadas em série). Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total µg	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da Proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação**
“Desalting”	450	120000	0,008	960	100	100	1
Recirculado SP-Q	450	57420	0	0	47,85	0	0
Lavado Q-Sepharose	32	1385,40	0,0093	12,88	1,15	1,34	1,16
Fração 1 Q NaCl 0,35 M	12,5	9699,25	0,019	184,28	8,08	19,19	2,37
Fração 2 Q NaCl 0,35 M	9,0	1009,05	0	0	0,84	0	0
Fração 1 Q NaCl 1,05 M	4	213,17	0,085	18,11	0,17	1,88	10,62
Fração 2 Q NaCl 1,05 M	2	734,22	0,047	34,50	0,61	3,59	5,87
Lavado SP-Sepharose	10	624,1	0,023	14,35	0,52	1,49	2,87
Fração 1 SP NaCl 0,35 M	14	4769,5	0	0	3,97	0	0
Fração 2 SP NaCl 0,35 M	22,6	11639	0,055	640,14	9,70	66,68	6,87
Fração 1 SP NaCl 1,05 M	4	1129,64	0	0	0,94	0	0
Fração 2 SP NaCl 1,05 M	3,5	1605,06	0	0	1,33	0	0

Quatrocentos e cinquenta mililitros do “pool” do primeiro pico do “desalting” (120 mg) foram aplicados nas colunas SP-Sepharose e Q-Sepharose, conectadas em série (5 mL cada). Após a aplicação da amostra, as colunas foram desconectadas, lavadas com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 50 mM e eluídas separadamente com o tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de 0,35 e 1,05 M de NaCl.

AIE = Atividade inibitória específica

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

Os perfis eletroforéticos das frações ativas para inibir tripsina eluídas da coluna Q-Sepharose e da coluna SP-Sepharose foram diferentes (Figura 4.2.3.2). A fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M apresentou bandas de 50, 30, 20 e 14 kDa (Figura 4.2.3.2, poço 5). O “pool” das frações 1 e 2 eluídas da coluna de Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 1,05 M apresentou bandas de 20, 14, 6 e 3 kDa (Figura 4.2.3.2, poço 6). Enquanto a fração 2 eluída da SP-Sepharose NaCl 0,35 M apresentou bandas de 27 e 17 kDa (Figura 4.2.3.2, poço 9). O “pool” da fração 1 e da fração 2 eluídas da SP-Sepharose Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 1,05 M apresentou bandas de 27, 20, 17, 14 e 12 kDa (Figura 4.2.3.2, poço 10).

Figura 4.2.3.2 – SDS-PAGE 15%. Análise eletroforética das frações eluídas da Q-Sepharose e SP-Sepharose. Após a aplicação da amostra (“pool” dos 1^{os} picos), as colunas foram desconectadas, lavadas e eluídas, separadamente, com tampão Tris-HCl pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M e 1,05 M. As amostras contendo 15 µg de proteína total foram aplicadas no gel, sob condições redutoras. **Os poços 4 a 6 contêm as frações da Q-Sepharose, e os poços 7 a 10 contêm as frações da SP-Sepharose. Poço 1:** padrão de massa molar. **Poço 2:** “pool” do 1^o pico do “desalting”. **Poço 3:** recirculado da SP-Sepharose e Q-Sepharose. **Poço 4:** lavado da Q-Sepharose. **Poço 5:** fração 1 eluída da Q-Sepharose com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **Poço 6:** “pool” das frações 1 e 2 eluídas da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 1,05 M. **Poço 7:** lavado da SP-Sepharose. **Poço 8:** fração 1 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **Poço 9:** fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **Poço 10:** “pool” das frações 1 e 2 eluídas da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 1,050 M.

As frações eluídas da Q-Sepharose (Figura 4.2.3.2, poço 5) e da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M (Figura 4.2.3.2, poço 9) foram utilizadas para carregar a coluna de afinidade tripsina-agarose.

A inibição de tripsina, a concentração de proteína e o fator de purificação das frações eluídas da cromatografia de afinidade carregada com a fração 2 da SP-Sepharose e com a fração 1 da Q-Sepharose, eluídas com NaCl 0,35 M, estão apresentadas nas tabelas 4.2.3.3 e 4.2.3.4, respectivamente. As frações ativas eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 2 NaCl 0,35 M da SP-Sepharose apresentaram 2,93% de recuperação da proteína total e 86,39% da inibição de tripsina (Tabela 4.2.3.3). As frações ativas eluídas da tripsina-agarose carregada com

a fração 1 NaCl 0,35 M da Q-Sepharose apresentaram 0,64% de recuperação da proteína total e 93,46% da inibição de tripsina (Tabela 4.2.3.4).

Tabela 4.2.3.3 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (µg)	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação**
Fração 2 SP NaCl 0,35 M	21	10815	0,055	594,82	100	100	1
Recirculado	21	7752,57	0,0090	69,72	71,68	11,72	0,16
Lavado	13	2075,71	0,0086	17,85	19,19	3,00	0,15
Fração 1	1,5	18,25	0	0	0,17	0	0
Fração 2	1,5	18,25	0,12	2,24	0,17	0,37	2,18
Fração 3	1,5	207,75	1,35	281,05	1,92	47,25	24,54
Fração 4	1,5	70,75	1,70	120,36	0,65	20,23	30,90
Fração 5	1,5	14,5	4,48	64,96	0,13	10,92	81,45
Fração 6	1,5	6,37	7,12	45,35	0,059	7,62	129,45

Vinte e um mililitros (10,81 mg) da fração 2 eluída da SP-Sepharose com NaCl 0,35 M foram aplicados na tripsina-agarose (3 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 250 mM, as frações (1,5 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0.

AIE = Atividade inibitória específica

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

Tabela 4.2.3.4 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina das frações eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (µg)	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da proteína (%)	Recuperação AIE (%)	Fator de purificação**
Fração 1 Q NaCl 0,35 M	12	9311,28	0,019	174,27	100	100	1
Recirculado	12	6660	0	0	71,53	0	0
Lavado	9,0	2228,25	0	0	23,93	0	0
Fração 1	1,5	10,25	0,077	0,79	0,11	0,45	4,12
Fração 2	1,5	5,12	0	0	0,055	0	0
Fração 3	1,5	10,13	1,50	15,26	0,11	8,76	80,21
Fração 4	1,5	30,75	1,70	52,24	0,33	29,98	90,37
Fração 5	1,5	10,75	3,79	40,74	0,12	23,38	202,67
Fração 6	1,5	8,25	6,62	54,62	0,088	31,34	354,01

Doze mililitros (9,31 mg) da fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M foram aplicados na tripsina-agarose (3 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 250 mM, as frações (1,5 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0.

AIE = Atividade inibitória específica

**AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

*Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

As frações eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M, e as frações eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M foram caracterizadas pelo SDS-PAGE, e os resultados foram apresentados na figura 4.2.3.3. Bandas de massas molares semelhantes a aprotinina bovina comercial (6,5 kDa) foram visualizadas nas frações ativas eluídas das cromatografias de afinidade carregadas com a fração 2 eluída da SP-Sepharose e com a fração 1 eluída da Q-Sepharose (com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M) (Figura 4.2.3.3 A, poços 3, 4 e 5 e Figura 4.2.3.3 B, poços 3 e 4, respectivamente). As frações eluídas da cromatografia de afinidade carregada com a fração 2 da SP-Sepharose eluída com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de 0,35 M de NaCl apresentaram além da banda majoritária ao redor de 7 kDa, outras duas bandas: 17 e 14 kDa, sendo a banda de 17 muito tênue (Figura 4.2.3.3 A, poços 3, 4 e 5). O pool das frações 5 e 6 eluídas da cromatografia de afinidade carregada com a fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M apresentou apenas uma banda ao redor de 7 kDa (Figura 4.2.3.3 B, poço 4), esta banda foi reconhecida pelo anticorpo policlonal anti aprotinina bovina sugerindo dessa forma, a existência de determinantes antigênicos comuns entre a aprotinina suína

e a aprotinina bovina (Figura 4.2.3.3 D, poço 2). A zimografia reversa deste “pool” apresentou também uma banda com atividade inibitória para tripsina e migração eletroforética semelhante à aprotinina bovina comercial (Figura 4.2.3.3 C, poço 4). A banda ao redor de 7 kDa presente nas frações eluídas da tripsina-agarose, carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M foi também reconhecida pelo anticorpo policlonal anti aprotinina bovina (Figura 4.2.3.3 D, poço 1) e confirmada no zimograma (Figura 4.2.3.3 C, poço 5). No entanto, uma banda com atividade inibitória para tripsina e migração eletroforética semelhante ao soybean foi também visualizada nesta fração (Figura 4.2.3.3 C, poço 5) e não reconhecida pelo anticorpo policlonal anti-aprotinina bovina (Figura 4.2.3.3 D, poço 1). A existência deste outro inibidor básico, ácido estável, é discutida no próximo item.

A aprotinina bovina por ser uma proteína básica (pI 10,5), nas condições de troca-iônica em pH 7,0, usadas neste trabalho não adsorveu como esperado apenas na SP-Sepharose (resina trocadora de cátions). Siekmann et al. (1988) purificaram de pulmão bovino seis aprotininas homólogas com diferentes pontos isoelétricos. Também Ikekita et al. (1992) purificaram de glândula pituitária bovina dois inibidores de caliceína (aprotinina); um aniônico e o outro catiônico, majoritário, com massa molecular semelhante a aprotinina.

Com este protocolo de purificação podem ser obtidos 85 µg de aprotinina suína por quilograma de pulmão suíno a partir da fração da coluna Q-Sepharose (Tabela 4.2.3.5).

Tabela 4.2.3.5 – Rendimento estimativo da purificação da aprotinina suína. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (µg)	AIE (UI/µg)	AIE total	Recuperação da proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação
SPA 2	1500	1290000	0,0035	4515	100	100	1
Desalting	1929	514285,71	0,008	4114,28	91,12	39,86	2,28
Fração Q 0,35 M NaCl	53,58	41577,45	0,019	789,97	17,49	3,22	5,43
Aprotinina suína	13,39	84,83	5,20	602,33	13,34	0,0065	1485,71

Considerando que de 1 kg de pulmão suíno são obtidos 1500 ml de SPA 2 (sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA). O SPA 2 foi aplicado na coluna “desalting” Hi Prep™. O “pool” dos 1^{os} picos ativo para inibir tripsina foi aplicado nas colunas SP-Sepharose e Q-Sepharose conectadas em série. Após a aplicação da amostra as colunas foram desconectadas e eluídas separadamente. A fração eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M e ativa para inibir tripsina foi aplicada na coluna de afinidade, tripsina-agarose. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 250 mM, as frações (1,5 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. Os cálculos foram feitos a partir dos dados apresentados nas tabelas 4.2.3.1, 4.2.3.2 e 4.2.3.4.

SPA2 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA

AIE = Atividade inibitória específica

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg)

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna

Como a aprotinina no pulmão bovino está presente na concentração de 0,02% (GREIGHTON e CHARLES, 1987a), o pulmão bovino ainda é a principal fonte natural de obtenção deste inibidor. A baixa concentração da aprotinina nos pulmões de suíno pode tornar inviável economicamente o desenvolvimento de metodologia para sua purificação e produção em larga escala ainda que tenhamos a doação da matéria prima. A idéia inicial era sua produção para uso terapêutico como anticoagulante e / ou insumo utilizado na inibição de reações proteolíticas indesejadas, durante coleta e estocagem de fluidos biológicos, extratos tissulares, e na purificação de proteínas. Entretanto a não restrição da aprotinina aos ruminantes (LASKOWSKI e KATO, 1980; FIORETTI et al., 1990; ELEUTERI et al., 1994) foi comprovada neste trabalho, apoiando as semelhanças morfofuncionais dos pulmões de mamíferos terrestres (FOOT et al., 2006) e a provável função do inibidor na proteção dos tecidos elásticos do pulmão contra NE (BUSINARO et al., 1988).

Para ainda reforçar a existência da aprotinina suína sua sequência de nucleotídeos a partir do DNA genômico extraído de pulmão suíno foi obtida e os resultados estão descritos no próximo item.

Figura 4.2.3.3 – Caracterização da aprotinina purificada de pulmão suíno. **(A)** A fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M e **(B)** a fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M foram aplicadas, separadamente, na coluna tripsina-agarose. A coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,8 acrescido de NaCl 250 mM e eluída com HCl 10 mM pH 2,0. **A e B** – **SDS-PAGE (15%)**. As amostras contendo 5 µg de proteína total foram aplicadas no gel, sob condições redutoras: **A - Poço 1:** padrão de massa molar. **Poço 2:** Fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **Poço 3:** fração 3 eluída da tripsina-agarose. **Poço 4:** fração 4 eluída da tripsina-agarose. **Poço 5:** “pool” das frações 5 e 6 eluídas da tripsina-agarose. **B - Poço 1:** padrão de massa molar. **Poço 2:** fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **Poço 3:** fração 4 eluída da tripsina-agarose. **Poço 4:** “pool” das frações 5 e 6 eluídas da tripsina-agarose. **C** – **Zimografia reversa**. As amostras, contendo 1 µg de proteína total, foram aplicadas, sob condições não redutoras, no gel de SDS-PAGE (15%) contendo gelatina copolimerizada. Após a eletroforese, o gel foi incubado com tampão Tris-HCl contendo tripsina durante 2 horas e corado com “coomassie blue”. **Poço 1:** soybean. **Poço 2:** aprotinina bovina comercial. **Poço 3:** vazio. **Poço 4:** “pool” das frações 5 e 6 da tripsina-agarose carregada com a fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **Poço 5:** “pool” das frações 5 e 6 da tripsina-agarose carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **D** – **“Western Blott”**. As amostras contendo 10 µg de proteína total foram aplicadas em gel (SDS-PAGE 15%) sob condições redutoras. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, a seguir a membrana foi incubada, com anticorpo policlonal anti aprotinina bovina, e revelada com DAB. **Poço 1:** “pool” das frações 5 e 6 da tripsina-agarose carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de 0,35 M NaCl. **Poço 2:** “pool” das frações 5 e 6 da tripsina-agarose carregada com a fração 1 eluída da Q-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **Poço 3:** vazio. **Poço 4:** aprotinina bovina comercial.

4.2.4 Sequência de nucleotídeos da aprotinina obtida a partir de pulmão suíno

A sequência de nucleotídeos da aprotinina foi amplificada a partir do DNA genômico extraído de pulmão bovino (418 µg/mL) e do DNA genômico extraído de pulmão suíno (254 µg/mL). Os oligonucleotídeos “forward” e “reverse” (20 nucleotídeos cada) foram desenhados a partir da sequência de aminoácidos da aprotinina bovina (KASSELL, 1970; ANDERSON e KINGSTON, 1983). Bandas de 174 pares de bases do éxon do meio que codifica a proteína madura foram amplificadas a partir do DNA extraído de pulmão bovino (controle positivo) e do DNA extraído de pulmão suíno (Figura 4.2.4.1 A, poços 2 e 3). As bandas amplificadas a partir do DNA genômico bovino e do DNA genômico suíno foram sequenciadas, e as sequências obtidas apresentadas na figura 4.2.4.1 B 1 e 2, respectivamente. Dois clones foram obtidos a partir do DNA genômico bovino e ambos alinharam com a sequência de nucleotídeos da aprotinina bovina descrita na literatura. Quinze clones foram obtidos a partir do DNA genômico suíno. Estes clones foram sequenciados, e oito destes clones alinharam com a sequência de nucleotídeos da aprotinina bovina, descrita na literatura. A sequência de nucleotídeos da aprotinina suína apresentou 74% de identidade com a sequência de nucleotídeos da aprotinina bovina, ou seja, 135 nucleotídeos da aprotinina suína foram idênticos aos nucleotídeos da aprotinina bovina. A sequência parcial do gene da aprotinina suína foi depositada no banco de dados “Gene Bank” do NCBI recebendo a identificação EU392176.

As sequências de nucleotídeos amplificadas a partir do DNA genômico bovino e suíno foram traduzidas utilizando o programa “Translate tool” disponível “on line”. A sequência predita de aminoácidos da aprotinina suína (Figura 4.2.4.2) foi depositada no banco de dados “Protein” do NCBI recebendo a identificação de ABY82797. A sequência de aminoácidos predita da aprotinina bovina foi 100% idêntica à sequência da aprotinina bovina descrita na literatura.

Figura 4.2.4.1 – Sequência de nucleotídeos da aprotinina suína. **A – PCR.** Reação de PCR demonstrando a amplificação de um fragmento de 174 pb interno ao gene da aprotinina. O produto da amplificação do DNA extraído de pulmão suíno e bovino foi visualizado em gel de agarose (2%). **Poço 1:** padrão de massa molecular (pb). **Poço 2:** DNA amplificado de pulmão bovino. **Poço 3:** DNA amplificado de pulmão suíno. **B – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da aprotinina bovina e da aprotinina suína** (174 pb). As seqüências parciais de nucleotídeos da aprotinina bovina e da aprotinina suína foram alinhadas e as regiões homólogas realçadas em cinza. **1:** seqüência do gene da aprotinina bovina. **2:** seqüência do gene da aprotinina suína.

A seqüência predita de aminoácidos da aprotinina suína (Figura 4.2.4.2, 2) apresentou 74% de identidade e 86% de similaridade com a seqüência de aminoácidos da aprotinina bovina (Figura 4.2.4.2, 1). A aprotinina suína apresentou oito resíduos de aminoácidos diferentes (27 – 28 – 29 – 31 – 32 – 39 – 46 – 47) e sete resíduos de aminoácidos similares (18 – 20 – 25 – 26 – 34 – 42 e 48) a aprotinina bovina, considerando-se a carga e a polaridade dos resíduos de aminoácidos, para esta comparação.

A aprotinina bovina apresenta regiões conservadas dentro do sítio reativo, aparentemente, por razões funcionais e estruturais. Dentre estes exemplos temos os resíduos de cisteínas 14 e 38, os resíduos glicínicos 12, 36 e 37, o resíduo prolínico 13 e o resíduo aromático 35 (GREIGHTON, 1975). Estas regiões conservadas dentro do sítio ativo estão também conservadas na aprotinina suína (Figura 4.2.4.4). Outra característica importante e que também foi apresentada pela aprotinina suína foi o resíduo P1 (Lys-15). Este resíduo é necessário para a inibição de tripsina e é exposto na conformação em forma de pêra na molécula da aprotinina bovina (Figura 1.2.1.1.2) (CHAUVET e ACHER, 1975; LASKOWSKI e KATO, 1980).

1 RPDFCLEPPYTGPCKAR IIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCR AKRNNFKSAEDCMRTC GGA
2 RPDFCLEPPYTGPCKARMIKYFYN IIRSRSC EEFIYGGCEAKKNNFEAMEDCMRTC GGA

Figura 4.2.4.2 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da aprotinina bovina e da sequência predita de aminoácidos da aprotinina suína. As sequências de aminoácidos da aprotinina bovina e a sequência predita de aminoácidos da aprotinina suína foram alinhadas. Os aminoácidos idênticos estão realçados em cinza os aminoácidos similares estão realçados em amarelo. **1:** sequência de aminoácidos da aprotinina bovina. **2:** sequência predita de aminoácidos da aprotinina suína.

A aprotinina bovina apresenta 10 resíduos de caráter básico (6 resíduos de arginina e 4 resíduos de lisina) e 4 resíduos de caráter ácido (2 resíduos de ácido aspártico e 2 resíduos de ácido glutâmico) (Tabela 4.2.4.1). Isto confere a aprotinina bovina forte caráter básico com ponto isoelétrico próximo de 10,5 (FRITZ e WUNDERER, 1983). A sequência predita da aprotinina suína apresentou 9 resíduos de caráter básico (5 resíduos de arginina e 4 resíduos de lisina) e 8 resíduos de caráter ácido (2 resíduos de ácido aspártico e 6 resíduos de ácido glutâmico) (Tabela 4.2.4.1). Portanto, a aprotinina suína apresentou 4 resíduos de aminoácidos ácidos a mais e um básico a menos que a aprotinina bovina que contribuíram para o ponto isoelétrico menor da aprotinina suína. Os pontos isoelétricos teóricos da aprotinina suína e da aprotinina bovina determinados pelo programa “ProtParam” (GASTEIGER et al., 2005) foram respectivamente 7,71 e 9,24 (Tabela 4.2.4.2).

Tabela 4.2.4.1 – Composição de aminoácidos da aprotinina bovina e da aprotinina suína (predita). A sequência predita da aprotinina suína foi obtida a partir da tradução dos nucleotídeos amplificados do DNA genômico extraído de pulmão suíno.

Aprotinina bovina ¹			Aprotinina suína ²	
Aminoácido	Número de resíduos de aminoácidos	Porcentagem de resíduos de aminoácidos	Número de resíduos de aminoácidos	Porcentagem de resíduos de aminoácidos
Ala (A)	6	10,3%	4	6,9%
Arg (R)	6	10,3%	5	8,6%
Asn (N)	3	5,2%	3	5,2%
Asp (D)	2	3,4%	2	3,4%
Cys (C)	6	10,3%	7	12,1%
Gln (Q)	1	1,7%	0	0,0%
Glu (E)	2	3,4%	6	10,3%
Gly (G)	6	10,3%	4	6,9%
His (H)	0	0,0%	0	0,0%
Ile (I)	2	3,4%	3	5,2%
Leu (L)	2	3,4%	1	1,7%
Lys (K)	4	6,9%	4	6,9%
Met (M)	1	1,7%	3	5,2%
Phe (F)	4	6,9%	4	6,9%
Pro (P)	4	6,9%	4	6,9%
Ser (S)	1	1,7%	2	3,4%
Thr (T)	3	5,2%	2	3,4%
Trp (W)	0	0,0%	0	0,0%
Tyr (Y)	4	6,9%	4	6,9%
Val (V)	1	1,7%	0	0,0%

¹composição de aminoácidos da aprotinina bovina (ANDERSON e KINGSTON,1983).

²composição de aminoácidos da aprotinina suína predita (EU392176).

Tabela 4.2.4.2 – Propriedades físico-químicas da aprotinina bovina e da aprotinina suína.

	Aprotinina bovina	Aprotinina suína
Número de aminoácidos	58	58
PI teórico	9,24	7,71
Massa molecular (Da)	6517,5	6745,7
Resíduos básicos	(Arg + Lys): 10	(Arg + Lys): 9
Resíduos ácidos	(Asp + Glu): 4	(Asp + Glu): 8

Em suma este item abordou o isolamento e a purificação do ortólogo suíno da aprotinina bovina, objetivo principal deste trabalho. A aprotinina suína apresenta alta identidade com a aprotinina bovina 74% (DIAS et al., 2008).

4.3 Purificação do inibidor de 16 kDa membro da família dos Antileucoproteínases

As frações 3 e 4 eluídas da cromatografia de afinidade (tripsina-agarose) carregada com a fração 2 da SP-Sepharose eluída com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M (Figura 4.2.3.3 A, poços 3 e 4) apresentaram 2 bandas de menor migração eletroforética (17 e 14 kDa). Os resultados do “western blot” do pool destas frações utilizando os anticorpos policlonais anti aprotinina bovina e anti SLPI recombinante de camundongo estão apresentados na figura 4.3.1 A e B. O anticorpo policlonal anti aprotinina bovina reconheceu a aprotinina bovina comercial, porém nenhuma banda do “pool” destas frações foi reconhecida por este anticorpo (Figura 4.3.1 A, poços 1 e 2). Provavelmente a quantidade transferida da aprotinina presente nestas frações não foi suficiente para o anticorpo reconhecê-la, uma vez que a aprotinina não é a banda majoritária nestas frações (Figura 4.2.3.3 A, poços 3 e 4). Por outro lado, as bandas de 17 e 14 kDa foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal anti SLPI recombinante de camundongo (Figura 4.3.1 B, poços 1 e 2). Este resultado indica homologia entre estas bandas e SLPI. Conseqüentemente tentamos sua caracterização.

Faller et al. (1992) mostraram que o SLPI se liga a heparina podendo, portanto, ser purificado pela cromatografia de afinidade heparina-agarose. Dessa forma o “pool” destas frações contendo 169 µg de proteína total (com atividade específica de inibição de tripsina de 1,40) foram aplicadas na coluna heparina-Sepharose. A coluna foi eluída com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,8 acrescido de seis diferentes concentrações de NaCl: 150, 250, 500, 750, 1000 e 1500 mM. A inibição de tripsina foi detectada apenas na primeira fração eluída com 1,5 mL de NaCl 0,5 M. Esta fração apresentou 27 µg de proteína total e atividade específica de inibição de tripsina de 0,82, e foi caracterizada por “Western blot”. SLPI foi eluído da coluna de afinidade heparina-Sepharose com 0,7 M de NaCl por Faller et al. (1991) e com 0,5 M de NaCl por Mellet et al. (1995).

Figura 4.3.1 – Caracterização imunoenzimática (“Western blot”) do “pool” das frações 3 e 4 eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. As amostras contendo 10 µg de proteína total foram aplicadas em gel (SDS-PAGE 15%) sob condições redutoras. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti aprotinina bovina (A) e anti SLPI (B), e revelada com DAB. **(A) anticorpo policlonal anti aprotinina bovina. Poço 1:** aprotinina bovina comercial. **Poço 2:** “pool” das frações 3 e 4 da tripsina-agarose carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M. **(B) anticorpo policlonal anti SLPI recombinante de camundongo. Poço 3:** aprotinina bovina comercial. **Poço 4:** “pool” das frações 3 e 4 da tripsina-agarose carregada com a fração 2 da SP-Sepharose eluída com NaCl 0,35 M.

O anticorpo anti SLPI reconheceu as bandas de 17 e 14 kDa presentes na fração eluída da heparina-Sepharose e no “pool” das frações 3 e 4 da cromatografia de afinidade (tripsina-agarose) (Figura 4.3.2, poços 4 e 7, respectivamente). Uma banda de 14 kDa foi também reconhecida na saliva humana (Figura 4.3.2, poços 1 e 2). A saliva humana foi utilizada como controle positivo para o SLPI. A concentração fisiológica de SLPI neste fluido é de 0,1 a 24 µg/mL (DOUMAS et al., 2005; WELDON et al., 2007). A concentração de proteína da fração eluída da heparina-Sepharose não foi suficiente para o sequenciamento do N-terminal deste inibidor. Portanto, uma

nova purificação se fez necessária, para a continuidade da caracterização. Um protocolo simplificado de purificação foi utilizado e está descrito resumidamente na figura 4.3.3.

Figura 4.3.2 – Caracterização imunoenzimática (“Western blot”) da fração 0,5 M de NaCl eluída da heparina-Sepharose carregada com o “pool” das frações 3 e 4 eluídas da tripsina-agarose (carregada com a fração 2 eluída da SP-Sepharose com Tris-HCl 10 mM pH 7,0 acrescido de NaCl 0,35 M). As amostras foram aplicadas em gel (SDS-PAGE 15%) sob condições redutoras. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti SLPI recombinante de camundongo, e revelada com DAB. **Poço 1:** saliva humana 1 (30 µg). **Poço 2:** saliva humana 2 (30 µg). **Poço 3:** vazio. **Poço 4:** fração 1 eluída da heparina-Sepharose com NaCl 0,5 M. **Poço 5:** lavado da heparina-Sepharose. **Poço 6:** “Flow-through” da heparina-Sepharose. **Poço 7:** “pool” das frações 3 e 4 eluídas da tripsina-agarose.

Figura 4.3.3 – Fluxograma da purificação de SLPI. O SPA 2 (Sobrenadante da precipitação ácida com 2,5% TCA) foi concentrado utilizando membrana de 100 kDa. O filtrado de 100 kDa foi concentrado utilizando membrana de 3 kDa. Os concentrados de 3 e 100 kDa foram aplicados, individualmente, na coluna de tripsina-Sepharose (8,0 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada e as frações eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. O “pool” da fração 4 e da fração 6 eluída da tripsina-Sepharose, carregada com o concentrado de 100 kDa, foi injetado na coluna C 18. Os picos foram eluídos utilizando gradiente linear de solvente A (ácido trifluoroacético 0,1% v/v em água) e solvente B (acetonitrila 90% + 10% do solvente A).

O SPA 2 foi concentrado utilizando uma membrana de fibra oca de corte nominal de 100 kDa. O filtrado de 100 kDa obtido foi então concentrado utilizando uma membrana de 3 kDa. A tabela 4.3.1 apresenta a concentração de proteína e inibição de tripsina do concentrado de 100 kDa e do concentrado de 3 kDa. A atividade específica de inibição de tripsina do concentrado de 3 kDa foi maior que a atividade específica do concentrado de 100 kDa (Tabela 4.3.1). Os perfis eletroforéticos do concentrado de 100 kDa (Figura 4.3.4 B, poço 2) e do concentrado de 3 kDa (Figura 4.3.4 A, poço 2) apresentaram tanto bandas de alta massa molar como bandas ao redor de 14 kDa. O concentrado de 100 e o concentrado de 3 kDa foram, individualmente, utilizados para carregar a coluna de afinidade tripsina-Sepharose (8 mL). Apesar dos resultados anteriores mostrarem que as frações da cromatografia de afinidade apresentaram um número variado de bandas esta cromatografia foi escolhida novamente por concentrar as proteínas com atividade específica ao ligante, neste caso a tripsina.

Tabela 4.3.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina do concentrado de 100 e 3 kDa. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (mg)	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da proteína (%)	Recuperação AIE (%)	Fator de purificação**
SPA 2	2050	2981,27	0,0021	6260,66	100	100	1
Concentrado 100 kDa	86	220,65	0,0041	904,66	7,4	14,45	1,95
Concentrado 3 kDa	96	373,16	0,010	3731,65	12,51	59,60	4,76

O SPA 2 (Sobrenadante da precipitação ácida com 2,5% TCA) foi concentrado utilizando membrana de 100 kDa. O filtrado de 100 kDa foi concentrado utilizando membrana de 3 kDa.

SPA2 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 2,5% TCA.

AIE = Atividade inibitória específica.

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg).

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna.

As frações eluídas da resina tripsina-Sepharose (8,0 mL) carregadas com o concentrado de 3 kDa e com o concentrado de 100 kDa foram analisados quanto à concentração total de proteína e inibição de tripsina (Tabela 4.3.2 e 4.3.3, respectivamente). As recuperações da concentração de proteína e da atividade específica de inibição de tripsina das frações eluídas da cromatografia de afinidade foram de 0,20% e 36% para o concentrado de 3 kDa (Tabela 4.3.2) e de 0,20% e 46% para o concentrado de 100 kDa (Tabela 4.3.3).

Tabela 4.3.2 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina durante o processo de purificação de SLPI a partir do concentrado de 3 kDa. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (µg)	AIE (UI/µg)	AIE total	Recuperação Proteína (%)	Recuperação AIE (%)	Fator de purificação
Concentrado 3	92	369278,3	0,010	3692,78	100	100	1
“Flow-through” 1	92	135377,42	0	0	36,66	0	0
Lavado	33	26030,70	0	0	7,04	0	0
Lavado	22	92,30	nd	nd	0,025	nd	nd
Fração 1	6,0	40	0	0	0,01	0	0
Fração 2	6,0	40	0	0	0,01	0	0
Fração 3	6,0	353,80	0,06	22,64	0,096	0,61	6,4
Fração 4	6,0	78,42	0,10	7,842	0,021	0,21	10
Fração 5	6,0	567,66	1,76	999,08	0,15	27,05	176
Fração 6	6,0	64,62	2,05	132,47	0,017	3,58	205
Fração 7	6,0	34,62	1,64	57,01	0,0094	1,54	164,7
Fração 8	6,0	39,24	1,37	53,99	0,010	1,46	137
Fração 9	6,0	27,66	1,48	41,09	0,0075	1,11	148
Fração 10	6,0	27,66	1,20	33,46	0,0075	0,90	121

Noventa e dois mililitros do concentrado de 3 kDa (369 mg) foram aplicados na tripsina-Sepharose. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 acrescido de 300 mM de NaCl e tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, respectivamente. As frações (6 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0.

AIE = Atividade inibitória específica.

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg).

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna.

nd = não determinado.

Tabela 4.3.3 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina durante o processo de purificação de SLPI a partir do concentrado de 100 kDa. Uma unidade de atividade inibitória específica foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (µg)	AIE (UI/µg)	AIE total	Recuperação Proteína (%)	Recuperação AIE %	Fator de purificação
Concentrado 100 kDa	80	187230,4	0,0041	776,852	100	100	1
“Flow-through” 1	80	107384,8	0	0	57,35	0	0
Lavado 1	50	22711,50	0	0	12,13	0	0
Lavado 2	42,5	767,97	0	0	0,41	0	0
Fração 1	8,0	80	0	0	0,043	0	0
Fração 2	8,0	80	0	0	0,043	0	0
Fração 3	8,0	196,88	0,033	6,59	0,10	0,85	8,05
Fração 4	8,0	230,80	0,70	161,71	0,12	20,82	170,8
Fração 5	8,0	73,84	1,92	141,65	0,04	18,23	467,8
Fração 6	8,0	40	0,58	23,39	0,021	3,0	142,60
Fração 7	8,0	32	0,88	28,44	0,017	3,66	216,34

Oitenta mililitros do concentrado de 100 kDa (187 mg) foram aplicados na tripsina-Sepharose. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 acrescido de 300 mM de NaCl e tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, respectivamente. As frações (8 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0.

AIE = Atividade inibitória específica.

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg).

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna.

Os perfis eletroforéticos das frações eluídas da tripsina-Sepharose, carregada com o concentrado de 3 kDa e com o concentrado de 100 kDa, estão apresentados nas figuras 4.3.4 A e 4.3.4 B, respectivamente. Bandas de 40, 37, 27, 20, 17, 15, 14 e abaixo de 14 kDa foram visualizadas nas frações ativas para inibir tripsina eluída da tripsina-Sepharose carregada com o concentrado de 3 kDa (Figura 4.3.4 A, poços 3, 4 e 5). As frações ativas para inibir tripsina eluídas da tripsina-Sepharose carregada com o concentrado de 100 kDa apresentaram bandas de 50, 27, 20, 17, 15 e 14 kDa (Figura 4.3.4 B, poços 3 e 4). O “pool” da fração 4 e da fração 6 eluídas da tripsina-Sepharose carregada com o concentrado de 100 kDa foi utilizado na próxima etapa de purificação (Figura 4.3.4 B, poço 3 e Figura 4.3.3).

Figura 4.3.4 – SDS-PAGE 15%. Análise eletroforética das frações eluídas da cromatografia de afinidade (tripsina-Sepharose). As amostras, concentrado de 3 kDa (369 mg) e concentrado de 100 kDa (187 mg), foram aplicadas, separadamente, na coluna tripsina-Sepharose (8,0 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 acrescido de 300 mM de NaCl e tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, respectivamente. As frações foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. As amostras contendo 10 µg de proteína total foram aplicadas no gel sob condições redutoras. **A – Concentrado de 3 kDa.** Poço 1: padrão de massa molar. Poço 2: concentrado 3 kDa. Poço 3: “pool” da fração 3 e 4. Poço 4: fração 5. Poço 5: “pool” das frações de 6 a 10. **B – Concentrado de 100 kDa.** Poço 1: padrão de massa molar. Poço 2: concentrado de 100 kDa. Poço 3: “pool” das frações 4 e 6. Poço 4: fração 5.

O “pool” das frações 4 e 6 eluídas da tripsina-Sepharose carregada com o concentrado de 100 kDa (Figura 4.3.4 B, poço 3), foi injetado na coluna C-18 de fase reversa acoplada ao sistema HPLC. Os picos foram eluídos entre 27% a 64,5% do gradiente formado pelo solvente A (ácido trifluoracético TFA 0,1% em água) e solvente B (acetonitrila 90% v/v + solvente A 10% v/v) (Figura 4.3.5 A). A inibição de tripsina dos picos foi determinada e está apresentada na figura 4.3.5 B.

Figura 4.3.5 – Perfil de eluição (A), concentração de proteína e inibição de tripsina (B) dos picos eluídos da cromatografia de fase reversa C-18. O “pool” das frações 4 e 6 da cromatografia de afinidade tripsina-Sepharose do concentrado de 100 kDa (Figura 4.3.4 B, poço 3) foram aplicados na coluna C-18. Os picos foram eluídos utilizando um gradiente linear de solvente A (ácido trifluoracético TFA 0,1% em água) e solvente B (acetonitrila 90% + solvente A 10%). **A - Perfil da eluição dos picos.** O gradiente foi estabelecido entre 5% e 80% do solvente B em 50 minutos. As proteínas foram eluídas a 0,5 mL/min, e coletadas manualmente de acordo com a densidade óptica a 214 nm. **B - Determinação da concentração de proteína e da inibição de tripsina dos picos.** Uma unidade de atividade inibitória específica foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 μg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Para o ensaio de inibição de tripsina foi utilizado 1 μg de proteína total de cada pico. Os picos 20 e 22, nestas condições, não inibiram tripsina (Figura 4.3.5 B). Os perfis eletroforéticos dos picos 16 a 20 foram caracterizados pelo SDS-PAGE (Figura 4.3.6 A). A banda ao redor 7 kDa (aprotinina suína) foi a única banda do pico 16 (Figura 4.3.6 A, poço 4), apresentando a segunda melhor atividade (Figura 4.3.5 B). O pico 17 apresentou três bandas protéicas tênues de 14, 7 e abaixo de 7 kDa (Figura 4.3.6 A, poço 5) e foi o mais ativo para inibir a tripsina (Figura 4.3.5 B), provavelmente por ser a associação de mais de um inibidor incluindo entre estes a aprotinina. O pico 18 apresentou uma banda majoritária ao redor de 14 kDa (Figura 4.3.6 A, poço 6) e apresentou atividade inibitória semelhante ao pico 19 que apresentou uma banda majoritária ao redor de 16 kDa (Figura 4.3.5 B e Figura 4.3.6 A, poço 7, respectivamente). A reatividade com o anticorpo policlonal anti SLPI recombinante de camundongo dos picos ativos para inibir tripsina eluídos da coluna de fase reversa C-18 foi investigada (Figura 4.3.6 B). O pico 19 apresentou maior reatividade com o anticorpo policlonal anti SLPI, seguido pelo pico 20 que também apresenta a banda ao redor de 16 kDa (Figura 4.3.6 B, Figura 4.3.6 A, poços 7 e 8).

Devido a maior reatividade do pico 19 com o anticorpo anti-SLPI, o N-terminal da banda de 16 kDa presente neste pico foi seqüenciado (Figura 4.3.6).

Figura 4.3.6 – Caracterização eletroforética e imunoenzimática dos picos eluídos da cromatografia de fase reversa. **A** – **SDS-PAGE 15%**. Dois µg de proteína total dos picos eluídos da coluna C-18 foram aplicados no gel, sob condições redutoras. **Poço 1**: padrão de massa molar. **Poço 2**: “Flow through”. **Poço 3**: pico 10. **Poço 4**: pico 16. **Poço 5**: pico 17. **Poço 6**: pico 18. **Poço 7**: pico 19. **Poço 8**: pico 20. **Poço 9**: pico 22. **Poço 10**: pico 24. **B** – **ELISA**. As placas foram sensibilizadas com 1 µg de proteína total, bloqueadas e incubadas com o anticorpo policlonal anti-SLPI (diluição 1:2000), incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A reação colorimétrica foi desenvolvida com a adição do substrato OPD, e a absorbância registrada a 492 nm.

A seqüência obtida a partir do N-terminal do pico 19 (Figura 4.3.6 A, poço 7) foi MLNP. Buscas foram feitas no banco de dados NCBI e nenhuma proteína com esta seqüência no N-terminal foi encontrada, salvo um fragmento descrito por Sallenave e Ryle (1991) durante a purificação do inibidor específico de elastase (ESI) atual elafina (SALLENAVE, 2000; MOREAU et al., 2008). Esta seqüência está presente tanto no domínio WAP da elafina quanto no domínio WAP II do SLPI (Figura 4.3.7) (BROWN et al., 2005; MOREAU et al., 2008). Uma vez que foi utilizada a cromatografia de afinidade tripsina-agarose para originar a amostra que carregou a coluna de fase reversa, a possibilidade deste inibidor ser elafina foi descartada pelo fato da elafina não inibir tripsina e estar presente em quantidades inferiores ao inibidor SLPI no pulmão normal (SALLENAVE e RYLE, 1991; MOREAU et al., 2008).

Figura 4.3.7 – Sequência de aminoácidos do 2º domínio de SLPI (WAP II) de três diferentes espécies de mamíferos. A região dentro dos traços verticais representa o sítio reativo do SLPI. Os resíduos de aminoácidos comuns entre as espécies estão realçados em cinza.

Como já mencionado, o inibidor SLPI é formado por dois domínios similares, o sítio reativo deste inibidor está compreendido entre a Leu-72 e a Met-73 no domínio C-terminal (NUKIWA et al., 2008). O 1º domínio do SLPI não apresenta atividade inibitória, mas ele ajuda a estabilizar o complexo SLPI-NE e medeia a ligação com a heparina. A ligação de SLPI a heparina aumenta a taxa de inibição da NE pelo SLPI, provavelmente como resultado da mudança na conformação do inibidor (MOREAU et al., 2008). Quando o SPLI é isolado utilizando a tripsina ou a quimotripsina imobilizada em matriz insolúvel ele pode ser clivado no sítio reativo (Leu-72) e ainda permanecer ativo (SEEMÜLLER et al., 1986). Isto explicaria a sequência obtida neste trabalho, e a manutenção da atividade pela presença de Met-73. Entretanto a massa molar deste fragmento seria em torno de 3 kDa. Uma provável explicação para a massa molar observada (ao redor de 16 kDa) seria a ligação da heparina aos resíduos de aminoácidos básicos do segundo domínio do SLPI. A heparina é sintetizada em células de mastócitos como uma proteoglicana consistindo de múltiplas cadeias de glicosaminoglicanas ligadas a um núcleo central de proteína. Durante o isolamento e purificação de biomoléculas utilizando tecidos como pulmão, a heparina é liberada de seu núcleo protéico e isolada como glicosaminoglicano (GAG). A heparina na forma de GAG é um polissacarídeo linear formado de estruturas repetidas: de 4 resíduos de glucosamina ligados a 1 resíduo de ácido urônico. A massa molar destas estruturas varia de 5 a 40 kDa, sendo 14 kDa, a média da massa molar desta estrutura (FATH et al., 1998). Portanto, a banda ao redor de 16 kDa do pico 19 (Figura 4.3.6 A, poço 7) seria o resultado da associação da heparina (ligação através dos resíduos básicos) ao fragmento do segundo domínio de SLPI, que preservou o sítio de ligação da tripsina (P1' Met-73) (Figura 4.3.7) (MOREAU et al., 2008).

Foi descrito o isolamento em pulmão do ortólogo suíno ativo de SLPI, ainda que clivado no seu segundo domínio. Nesta etapa do trabalho, o interesse foi principalmente caracterizar o inibidor de 16 kDa, detectado nas nossas condições de isolamento e purificação da aprotinina suína.

Novas metodologias agora já direcionadas para a purificação do SLPI de pulmão suíno poderão ser desenvolvidas, caso SLPI continue sendo considerado um candidato terapêutico promissor para uso no tratamento de doenças pulmonares crônicas e agudas. Esta notabilidade é em parte creditada as suas propriedades como inibidor de serinoproteínase, em parte devida as suas outras atividades biológicas como: antibacteriano, antifúngico, antiviral, participante do sistema imune inato, reparador de tecidos e ação antiinflamatória. A literatura cita que no fluido de revestimento do epitélio pulmonar a concentração do inibidor é de aproximadamente 10 µg/mL (WELDON et al., 2007).

Alguns protocolos têm sido desenvolvidos para pesquisar como administrar SLPI em condições de excesso de neutrófilos pulmonares e elastase neutrofílica, condições estas encontradas na fibrose cística (CF) (GAST, 1990; MCELAVANEY et al., 1993). Como a administração intravenosa de SLPI é contra indicada pelo fato de ser uma molécula pequena e rapidamente excretada na urina, McElvaney et al. (1993) administraram SLPI recombinante (rSLPI - Synergen, Boulder, CO) na forma de aerossol, na dosagem de 100 mg, duas vezes ao dia por uma semana, em 16 adultos com CF. Após o tratamento os níveis de HNE no fluido de revestimento do epitélio foram significativamente reduzidos e níveis de SLPI ativo ainda estavam presentes. Entretanto, as fases II e III dos ensaios clínicos ainda estão sendo aguardadas, e um dos principais questionamentos, parece ter sido o fato que SLPI na forma de aerossol assim como também outras drogas administradas desta maneira não se depositam bem em áreas pobremente ventiladas como são as áreas que necessitam do tratamento (MOREAU et al., 2008). Outro ponto importante pode estar relacionado com a produção da proteína recombinante em *E.coli*. Pelo fato da proteína se acumular intracelularmente numa forma inativa, ela precisa ser solubilizada e adequadamente renaturada na sua conformação biologicamente ativa, além disso, também a superexpressão da proteína resultou em citotoxicidade para *E.coli*. Outro sistema de expressão foi descrito para a superação destas dificuldades (o sistema de baculovírus) (GRAY et al., 2002).

De qualquer modo, SLPI é um componente importante do escudo humano anti-elastase no pulmão (HENRY, 2002). Por apresentar diferente reatividade de α_1 -AT, os dois inibidores da

elastase podem apresentar ação complementar (MARTIN et al., 2006). SLPI pode inibir elastase ligada a elastina enquanto α_1 -AT não (RICE, 1990), e pelo fato de sua ligação com HNE ser reversível, isto facilita a transferência da HNE para o α_1 -AT. SLPI embora também suscetível à oxidação, ainda permanece como um potente inibidor da HNE, o que não acontece com α_1 -AT (VOGELMEIER et al., 1996; VOGELMEIER et al., 1997). O mesmo se aplica à degradação do SLPI pelas metaloproteinases da matriz, um grupo de proteases liberadas pelos neutrófilos ativados que inativam α_1 -AT, mas não inativam SLPI (VISSERS et al., 1988; HENRY et al., 2002).

Um estudo clínico fase 1 (entre 2000 e 2003) que recebeu o número NCT00005569 do governo americano avaliou os efeitos tópicos de rSLPI na forma de um gel na cicatrização de feridas da pele de idosos (60-80 anos). O estudo completou a fase I e não foi possível recuperar na literatura os resultados obtidos nesta fase.

4.4 Purificação de inibidor de alta massa molecular a partir do SPA 1

Após a detecção de um inibidor majoritário de alta massa molecular no SPA1 (Figura 4.1.2 D, poço 2), essa amostra foi submetida à cromatografia de afinidade com o objetivo de purificar e identificar esse inibidor (Figura 4.4.1). Os resultados obtidos são apresentados neste item.

O SPA 1 foi aplicado, manualmente, na coluna de afinidade tripsina-agarose. As proteínas adsorvidas foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. A tabela 4.4.1 apresenta a concentração total de proteína e inibição de tripsina das frações eluídas da cromatografia de afinidade. Nesta cromatografia 96% das proteínas injetadas na coluna não foram adsorvidas à resina (Tabela 4.4.1). O “flow through” e o lavado apresentaram 17,39% da inibição inicial de tripsina (Tabela 4.4.1). A presença de atividades inibitórias no “flow-through” e no lavado podem indicar uma provável saturação da resina. As frações eluídas com HCl 10 mM (2 mL cada) apresentaram 0,30% de recuperação da proteína total aplicada na coluna e 51,53% de recuperação da inibição inicial de tripsina (Tabela 4.4.1). As frações 1 e 2 apresentaram fator de purificação da ordem de 200.

O “flow through”, o lavado e as frações eluídas foram também caracterizados quanto aos seus perfis eletroforéticos e identidades antigênicas. Os resultados são apresentados na figura 4.4.2.

Figura 4.4.1 – Fluxograma da purificação do inibidor de alta massa molecular a partir do SPA 1. O SPA 1 (Sobrenadante da precipitação ácida com 1,25% TCA) foi injetado na coluna tripsina-agarose (1 mL) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 acrescido de NaCl 0,25 M. As frações foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0, e imediatamente após a eluição o pH das frações foi ajustado para 7,8 com NaOH 1,0 M.

Tabela 4.4.1 – Concentração de proteína total e inibição de tripsina durante o processo de purificação do inibidor de alta massa molecular a partir do SPA 1. Uma unidade de atividade inibitória específica (AIE) foi definida, arbitrariamente, como a inibição de 1 µg de tripsina sobre condições padronizadas de ensaio utilizando BapNA como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Proteína total (µg)	AIE (UI/µg)	AIE total*	Recuperação da Proteína (%)	Recuperação da AIE (%)	Fator de purificação**
SPA-1	40	57200	0,0043	248	100	100	1
“Flow-through”	40	53780	$5,9 \times 10^{-4}$	31,75	94,02	12,80	—
Lavado	7	1361,5	0,0084	11,38	2,38	4,59	1,95
Fração 1	2,0	99,6	0,65	65,42	0,17	26,38	151,16
Fração 2	2,0	64	0,91	58,60	0,11	23,63	211,62
Fração 3	2,0	13,2	0,28	3,78	0,023	1,52	65,11

Quarenta mililitros do SPA 1 (57,2 mg) foram aplicados na tripsina-agarose (2,0 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 acrescido de 0,25 M de NaCl. As frações (2 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0.

SPA 1 = Sobrenadante obtido da precipitação ácida com 1,25% TCA.

AIE = Atividade inibitória específica.

*AIE total = AIE (UI/µg) x proteína total (µg).

**Fator de purificação = AIE (UI/µg) fração / AIE (UI/µg) da amostra utilizada para carregar a coluna.

Os perfis eletroforéticos das frações 1 e 2 eluídas da tripsina-agarose a partir do SPA 1 apresentaram várias bandas sob condições redutoras (Figura 4.4.2 A, poços 8 e 9, respectivamente). Uma banda majoritária de 50 kDa e bandas minoritárias de 40, 35, 27, 20, 17 e 14 kDa foram observadas nas frações 1 e 2. Para identificar dentre estas bandas quais seriam efetivamente inibidores de tripsina e responsáveis pela atividade presente nas frações, a metodologia da zimografia reversa foi utilizada. Esta metodologia, como já mencionado anteriormente, permite a identificação individual de uma proteína ativa (LÊ e KATUNUNA, 2004, SMITH et al., 2004). SPA 1 apresentou duas bandas com atividade inibitória na zimografia reversa; uma ao redor de 50 kDa majoritária e outra acima de 50 kDa (Figura 4.4.2 B, poço 3). As frações eluídas da tripsina-agarose apresentaram cinco inibidores de tripsina, três majoritários de alta massa molar (um acima e dois abaixo de 50 kDa), um quarto ao redor de 20 kDa e o quinto abaixo de 20 kDa (Figura 4.4.2 B, poço 7). Foi então aventada a possibilidade de estarmos isolando o inibidor α_1 -antitripsina. O α_1 -antitripsina é uma glicoproteína de 52 kDa, secretada principalmente pelos hepatócitos, e em menor quantidade pelas células epiteliais e fagócitos pulmonares. Nos pulmões, o α_1 -AT protege os tecidos conectivos contra a ação da NE liberada pela ativação dos neutrófilos durante o processo inflamatório (GORRINI et al., 2005). Assim a presença de α_1 -antitripsina no SPA 1 e suas frações foi investigada através da técnica de “western blot” utilizando o anticorpo policlonal contra α_1 -AT humano. O resultado desta análise

imunoenzimática, inicialmente em condições não redutoras, mostrou que o anticorpo policlonal contra α_1 -AT humano reconheceu apenas uma banda de alta massa molar acima de 50 kDa no SPA 1 e na sua fração (Figura 4.4.2 C, poços 2 e 3 respectivamente). Sob condições redutoras, o mesmo anticorpo reconheceu uma banda ao redor de 50 kDa no SPA 1 e na sua fração apenas bandas de 27, 20 e 14 kDa (Figura 4.4.2 C, poço 7).

Figura 4.4.2 – Caracterização das frações eluídas da tripsina-agarose a partir do SPA 1. Quarenta mililitros do SPA 1 (57,2 mg) foram aplicados na tripsina-agarose (2,0 mL). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 acrescido de 0,25 M de NaCl. As frações (2 mL) foram eluídas com HCl 10 mM pH 2,0. **A** – **SDS-PAGE (15 %)**. As amostras contendo 30 μ g de proteína total foram aplicadas no gel, sob condições redutoras. **Poço 1**: BSA. **Poço 2**: padrão de massa molar. **Poço 3**: SPA 1. **Poços 4 e 5**: “Flow-through”. **Poço 6**: lavado. **Poço 7**: vazio. **Poço 8**: fração 1. **Poço 9**: fração 2. **B** – **Zimografia Reversa**. As amostras foram aplicadas, sob condições não redutoras, no gel de SDS-PAGE (15%) contendo gelatina copolimerizada. Após eletroforese, o gel foi incubado com tampão Tris-HCl contendo tripsina (8 horas), e corado com “coomassie blue”. **Poço 1**: soybean (5 μ g). **Poço 2**: SPA 1 (90 μ g). **Poço 3**: SPA 2 (15 μ g). **Poço 4**: SPA 2 (90 μ g). **Poços 5 e 6**: vazio. **Poço 7**: fração 2 (90 μ g). **C** – **“Western Blot”**. As amostras contendo 30 μ g de proteína total foram aplicadas em gel SDS-PAGE 15% sob condições não redutoras (poço de 1 a 3) e redutoras (poço de 5 a 7). Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF, e a seguir a membrana foi incubada com anticorpo policlonal contra α_1 -AT humano e revelada com DAB. **Poço 1**: α_1 -AT humano. **Poço 2**: SPA 1. **Poço 3**: fração 2. **Poço 4**: vazio. **Poço 5**: α_1 -AT humano. **Poço 6**: SPA 1. **Poço 7**: fração 2.

Pannell et al. (1974) observaram que α_1 -AT é inativado em pH abaixo de 5,0 durante sua purificação a partir de plasma humano. Entretanto, estes autores não verificaram se a incubação em um pH neutro por algum tempo restabeleceria sua atividade inibitória. Nordenman e Bjork (1981) usaram o dicroísmo circular e a espectroscopia fluorescente para demonstrar a mudança estrutural de α_1 -AT bovino em pH abaixo de 5,5. Eles descreveram que as mudanças estruturais

parecem ser irreversíveis. Boldier et al. (2007) mostraram que a atividade inibitória de $\alpha 1$ -AT é completamente eliminada quando este inibidor é incubado em pH 3,0 a 25 °C por 15 minutos e a seguir neutralizado para pH 7,4. Provavelmente, a condição utilizada para purificar o inibidor ácido estável inativou o $\alpha 1$ -AT. Outro fator de inativação foi a clivagem do sítio reativo deste inibidor durante a cromatografia de afinidade tripsina-agarose.

As bandas com atividade inibitória na zimografia reversa da fração ativa eluída da tripsina-agarose (Figura 4.4.2 B, poço 7) indicam a presença de outro inibidor de serinoproteinase ácido estável, por exemplo, bikunina. Este inibidor é produzido pelas células hepáticas e renais, está presente no sangue, urina e outros fluídos corporais e que primariamente atuaria como um transportador da proteinase para outro inibidor de pouca especificidade como α_2 -macroglobulina (YANG et al., 2005). Estes autores observaram que em todas as suas preparações havia uma forma de bikunina de 17 kDa minimamente glicosilada/sulfatada e em algumas outras preparações uma forma de bikunina 33-48 kDa. O núcleo protéico da bikunina é de 16 kDa e ele contém dois domínios inibitórios tipo Kunitz, que são sulfatados e glicosilados nas cadeias laterais. O produto final glicosilado/sulfatado é de aproximadamente 24 kDa. Devido à variação da adição de polissacarídeo e de sua sulfatação, bandas imunorreativas de 24 a 45 kDa são detectadas. Eles descreveram que preparações contendo as formas de 33-45 kDa tiveram atividade inibitória para tripsina duas ou três vezes maior que preparações sem estas formas. A bikunina é conhecida por inibir tripsina, quimotripsina, NE e plasmina (ZHUO et al., 2004). As duas bandas de inibidores de tripsina ao redor de 50 kDa (Figura 4.4.2 B, linha 7) que não foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal anti $\alpha 1$ -AT podem ser as formas de 33-48 kDa da bikunina suína.

A possibilidade de purificar a bikunina, IaI ou pré- α a partir de extratos pulmonares suínos pode ser uma alternativa interessante. Este inibidor é disponível como insumo na forma recombinante. Na Ásia é um medicamento em uso para o tratamento da pancreatite aguda (MATSUNO et al., 2006) e está em teste para outras aplicações clínicas. Além disto, a utilização desta família de inibidores como marcadores biológicos em diversas patologias é um campo também promissor. Desta forma poderá ser feito um maior investimento no desenvolvimento de protocolos de purificação para a obtenção deste inibidor a partir de pulmões suínos ou de outras fontes biológicas.

5 CONCLUSÃO

A aprotinina, inibidor de serino proteinase da família Kunitz, foi purificada a partir de pulmão suíno utilizando três passos cromatográficos (filtração em gel, troca-iônica e afinidade). A metodologia utilizada neste trabalho permitiu obter a partir de 1 kg de pulmão suíno 85 µg de aprotinina. O cálculo do rendimento deste processo utilizou apenas as frações, com maior grau de pureza, obtidas da tripsina-agarose carregada com a fração 1 eluída da Q-Sepharose. As frações eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 2 da SP-Sepharose que apresentou a aprotinina suína não foram utilizadas por apresentar um grau de pureza menor. Portanto podemos concluir que o rendimento da aprotinina suína está subestimado. Dessa forma novos protocolos poderão ser desenvolvidos com o objetivo de aumentar este rendimento. Provavelmente um tampão com pH 4,0 ou pH 9,0 será mais adequado para a cromatografia de troca-catiônica ou troca-aniônica, respectivamente, aumentando a recuperação da aprotinina suína a partir do pulmão. Estes valores de pH, teoricamente, serão mais efetivos para recuperar a aprotinina suína tendo como princípio o ponto isoelétrico teórico calculado a partir da sequência do gene da aprotinina suína, obtida neste trabalho. A sequência do gene da aprotinina suína apresentou uma alta identidade com a sequência do gene aprotinina bovina, conservando os resíduos importantes para a função e estabilidade deste inibidor.

Um outro inibidor ácido estável foi purificado utilizando o protocolo de extração da aprotinina suína. Este inibidor foi identificado como sendo um fragmento do 2º domínio de SLPI, provavelmente, complexado a heparina e foi detectado nas frações eluídas da tripsina-agarose carregada com a fração 2 da SP-Sepharose NaCl 0,35 M (pH 7,0). A utilização da cromatografia de troca-iônica pH 4,0 utilizando a coluna trocadora de cátion poderá separar a aprotinina suína deste inibidor. O complexo SLPI-heparina ativo para inibir tripsina deverá ser caracterizado melhor através de técnicas como espectrometria de massa. A clivagem do SLPI no seu sítio reativo pode ter ocorrido durante o processo de extração ou purificação utilizando a cromatografia de afinidade, tripsina-agarose.

Um terceiro inibidor de alta massa molecular foi purificado a partir de pulmões suínos utilizando 1,25 % de TCA, metade da concentração utilizada para purificar a aprotinina suína. Este inibidor devido o tratamento ácido utilizado durante a extração dos inibidores resistente a

ácido e a cromatografia de afinidade tripsina-agarose não é o α -1AT. Nossa hipótese é que este inibidor seja a Bikunina, inibidor ácido resistente membro da família Kunitz. A Bikunina é um medicamento utilizado no Japão e na China e protocolos de purificação deste inibidor a partir do pulmão suíno utilizando novos procedimentos de extração sem o ácido tricloroacético poderão ser desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, S.; KINGSTON, I. B. Isolation of a genomic clone for bovine pancreatic trypsin inhibitor by using a unique-sequence synthetic DNA probe. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 80, p. 6838–6842, 1983.
- ARCHIBALD, A. L.; MCCLENAGHAN, M.; HORSNEY, V.; SIMONS, J.P.; CLARK, A. J. High-level expression of biologically active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, p. 5178–5182, 1990.
- BARRETT, A. J.; Rawlings, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS databases as a protease information system. **J. Struct. Biol.**, v. 134, p. 95–102, 2001.
- BAUMEISTER, W; LUPAS, A. The proteasome. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 7, p. 273–278, 1997.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93–99, 1987.
- BOND, J. S; BUTLER, E. Intracellular Proteases. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 56. p. 333–334, 1987.
- BOUDIER, C.; BOUSQUET, J-A.; SCHAUINGER, S.; MICHELS, B.; BIETH, J. G. Reversible inactivation of serpins at acidic pH. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 456, p. 155–163, 2007.
- BOURGUIGNON, J.; BORGHI, H.; SESBOÜÉ, R.; DIARRA-MEHRPOUR, M.;BERNAUDIN, J. F.; MÉTAYER, J.; MARTIN, J. P.; THIBERVILLE, L. Immunohistochemical distribution of inter-alpha-trypsin inhibitor chains in normal and malignant human lung tissue. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 47, n. 12, p. 1625–1632, 1999.
- BROWN, T. I.; MISTRY, R.; GRAY, R.; IMRIE, M.; COLLIE, D.D.; SALLENAVE, J. M. Characterization of the ovine ortholog of secretory leukoprotease inhibitor. **Mamm. Genome**, v. 16, n. 8, p. 621–630, 2005.
- BUSINARO, R.; FIORETTI, E.; FUMAGALLI, L.; CITRO, G.; DE RENZIS, G.; ASCOLI, F. Cellular localization of bovine pancreatic trypsin inhibitor and related molecular forms in bovine lung. **Histochem. J.**, v. 20, p. 187–193, 1988.
- CARP, H.; MILLER, F.; HOIDAL, J. R.; JANOFF. A. Potential mechanism of emphysema: α_1 -proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 79, p. 2041–2045, 1982.

CARREL, R. W.; JEPSSON, J. O.; VAUGHAN, L.; BRENNAN, S. O.; OWEN, M. C.; BOSWELL, D. R. Human α 1-antitrypsin: carbohydrate attachment and sequence homology. **FEBS Lett.**, v. 135, n. 2, p. 301–303, 1981.

CASATI, V.; ROMANO, A.; D'ANGELO, A. Safety of aprotinin (again). **Lancet**, v. 372, p. 27, 2008.

CASTILLO, G. M.; TEMPLETON, D. M. Subunit structure of bovine ESF (extracellular-matrix stabilizing factor(s)). A chondroitin sulfate proteoglycan with homology to human I alpha i (inter-alpha-trypsin inhibitors). **FEBS Lett.**, v. 318, p. 292–296, 1993.

CHAPMAN, H. A.; RIESE, R. J.; SHI, G. P. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 59, p. 63–88, 1997.

CHAUVET, J.; ACHER, R. The reactive sites of kunitz bovine-trypsin inhibitor. **Eur. J. Biochem.**, v. 54, p. 31–38, 1975.

CHEN, J.Y.; CHUANG, H.; PAN, C. Y.; KUO, C. M. cDNA sequence encoding an antimicrobial peptide of chelonianin from the tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 179–183, 2005.

CLAUSS, A.; LILJA, H.; LUNDWALL, A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. **Biochem. J.**, v. 368, p. 233–242, 2002.

COX, A. G.; ARMITAGE, P.; HOGG, R.; WELBOURN, R. B.; GILMORE, O. J. A.; MACKAY, C.; TRAPNELL, J. E.; WILLIAMSON, R. C. N. Morbidity of acute pancreatitis: the effect of aprotinin and glucagons. **Gut**, v. 21, p. 334–339, 1980.

DASH, C.; KULKARNI, A.; DUNN B.; RAO, M. Aspartic peptidases inhibitors: implications in drug development. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, n. 2, p. 89–119, 2003.

DIAS, S. C.; SAKAUCHI, D.; ABREU, P. A.; NETO, S. L.; IOURTOV, D.; RAW, I.; KUBRUSLY, F. S. Purification and characterization of aprotinin from porcine lungs. **Biotechnol. Lett.**, v. 30, p. 807–812, 2008.

DIETL, T.; TSCHESCHE, H. Trypsin-kallikrein isoinhibitor K (type-Kunitz) from Snails (*Helix pomatia*). **Eur. J. Biochem.**, v. 58, p. 453–460, 1975.

DÖRING, G. Serine proteinase inhibitors therapy in α 1-antitrypsin inhibitor deficiency and cystic fibrosis. **Pediatr. Pulmonol.**, v. 28, p. 363–375, 1999.

DOUMAS, S.; KOLOKOTRONIS, A.; STEFANOPOULOS, P. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1271–1274, 2005.

DRENTH, J. LOW, B. W.; RICHARDSON, J. S.; WRIGHT, C. S. The toxin-agglutinin fold. A new group of small protein structures organized around a four-disulfide core **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 2652–2655, 1980.

ELEUTERI, A. M.; ANGELETTI, M.; FIORETTI, E. Proteinase inhibitors of the Kunitz family in fallow deer organs: a comparative study. **Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.**, v. 107, n. 4, p. 539–545, 1994.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. Clustal W. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>>. Acesso em: 27 Ago. 2007.

EXPERT PROTEIN ANALYSIS SYSTEM. Translate tool. Disponível em: <<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>>. Acesso em: 27 Ago. 2007.

FALLER, B.; MELY, Y.; GERARD, D.; BIETH, J. G. Heparin-induced conformational change and activation of mucus proteinase inhibitor. **Biochemistry**, v. 31, p. 8285–8290, 1992.

FARMER, S. J.; FLISS, A. E.; SIMMEN, R. C. Complementary DNA cloning and regulation of expression of the messenger RNA encoding a pregnancy-associated porcine uterine protein related to human antileukoproteinase. **Mol. Endocrinol.**, v. 4, n. 8, p. 1095–1104, 1990.

FATH, M. A.; WU, X.; HILEMAN, R. E.; LINHARDT, R. J.; KASHEM, M. A.; NELSON, R. M.; WRIGHT, C. D.; ABRAHAM, W. M. Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with heparin inhibits proteases involved in asthma. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 22, p. 13563–13569, 1998.

FIORETTI, E.; ANGELETTI, M.; BARRA, D.; ASCOLI, F. Kunitz-type proteinases inhibitors in sheep and ox. **Comp. Biochem. Physiol., B**, v. 96, n. 3, p. 445–449, 1990.

FIORETTI, E.; BINOTTI, I.; BARRA, D.; CITRO, G.; ASCOLI, F.; ANTONINI, E. Heterogeneity of the pancreatic inhibitor (Kunitz) in various bovine organs. **Eur. J. Biochem.**, v. 130, p. 13–18, 1983.

FIORUCCI, L.; ERBA, F.; FALASCA.; DINI, L.; ASCOLI, F. Localization and interaction of bovine pancreatic trypsin inhibitor and tryptase in the granules of bovine mast cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1243, p. 407–413, 1995.

FOOT, N. J.; ORGEIG, S.; DANIELS, C.B. The evolution of a physiological system: the pulmonary system in diving mammals. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 154, p. 118–138, 2006.

FRIES, E.; BLOM, A. M. Bikunin – not just a plasma proteinase inhibitor. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 32, p. 125–137, 2000.

FRIES, E.; KACZMARCZK, A. Inter- α -inhibitor, hyaluronan and inflammation. **Acta. Biochim. Pol.**, v. 50, n. 3, p. 735–42, 2003.

FRITZ, H. Human Mucus Proteinase Inhibitor (human MPI) Human Seminal Inhibitor (HUSI-I), Antileukoprotease (ALP), Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI). **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v. 369, p. 79–82, 1988.

FRITZ, H.; KRUCK, J. Immunofluorescence studies indicates that the basic trypsin-kallikrein-inhibitor of bovine organs (Trasylol) originates from mast cell. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, v. 360, n. 437, p. 437–444, 1979.

FRITZ, H.; WUNDERER, G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. **Drug. Res.**, v. 33, n. 4, p. 479–494, 1983.

FURNARY, A. P.; WU, Y.; HIRATZKA, L. F.; CRUNKEMEIER, G. L.; SCOTTPAGE, U. Aprotinin does not increase the risk of renal failure in cardiac surgery patients. **Circulation**, v. 116, p. 127–133, 2007.

GARANTZIOTIS, S.; HOLLINGSWORTH, J. W.; GHANAYEM, R. B.; TIMBERLAKE, S.; ZHUO, L.; KIMATA, K.; SCHWARTZ, D. A. Inter-alpha-trypsin inhibitor attenuates complement activation and complement-induced lung injury. **J. Immunol.**, v. 179, n. 6, p. 4187 – 4192, 2007.

GAST, A.; ANDERSON, W.; PROBST, A.; NICK, H.; THOMPSON, R. C.; EISENBERG, S. P.; SCHNEBLI, H. Pharmacokinetics and distribution of recombinant secretory leucocyte protease inhibitor in rats. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, p. 889–894, 1990.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. Local: Humana Press, 2005. 571–607.

GEBHARD, W.; HOCHSTRASSER, K.; FRITZ, H.; ENGHILD, J. J.; PIZZO, S. V.; SALVESEN, G. Structure of inter- α -inhibitor (inter- α -trypsin inhibitor) and pre- α -inhibitor: current state and proposition of a new terminology. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v. 371, p. 13–22, 1990.

GETTINS, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 4751–4803, 2002.

GORRINI, M.; LUPI, A.; IADAROLA, P.; DOS SANTOS, C.; ROGNONI, P.; DALZOPPO, D.; CARRABINO, N.; POZZI, E.; BARITUSSIO, A.; LUISETTI, M. SP-A binds α 1-antitrypsin *in vitro* and reduces the association rate constant for neutrophil elastase. **Respir. Res.**, v. 6, n. 146, p. 1–12, 2005.

Gray, L. R.; Alexander, A. L.; Shugars, D. C. Construction, non-denaturing affinity purification, and characterization of baculovirally expressed human secretory leukocyte protease inhibitor. **Protein Expr. Purif.**, v. 26, p. 179–186, 2002.

GREIGHTON, T. E.; CHARLES, I. G. Sequences of the genes and polypeptide precursors for two bovine protease inhibitors. **J. Mol. Biol.**, v. 194, p. 1–22, 1987a.

GREIGHTON, T. E.; CHARLES, I. G. Biosynthesis, processing, and evolution of bovine pancreatic trypsin inhibitor. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 52, p. 511–519, 1987b.

GREIGHTON, T. E. Homology of protein structures: proteinase inhibitors. **Nature**, v. 255, p. 743–745, 1975.

HAMM, A.; VEECK, J.; BEKTAS, N.; WILD, P. J.; HARTMANN, A.; HEINDRICH, U.; KRISTIANSEN, G.; WERBOWETSKI-OGILVIE, T.; DEL MAESTRO, R.; KNUECHEL, R.; DAHL, E. Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis. **BMC Cancer**, v. 8, 2008. In press.

HENRY, M. **Antiprotease therapy in cystic fibrosis**. Leeds: LEEDS UNIVERSITY TEACHING HOSPITALS, 2001. Disponível em: <<http://www.cysticfibrosimedicine.com/index.html>>. Acesso em: 16 Jul. 2007.

HENRY, M. T.; MCMAHON, K.; COSTELLO, C.; FITZGERALD, M. X.; O'CONNOR, C. M. Secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin are resistant to degradation by MMP-8. **Exp. Lung Res.**, v. 28, p. 85–97, 2002.

HIEMSTRA, P. S. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, p. 116–120, 2002.

HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. C.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

HIMMELFARB, M.; KLOPOCK, I. E.; GRUBE, S.; STAUB, E.; KLAMAN, I.; HINZMANN, B.; KRISTIANSEN, G.; ROSENTHAL, A.; DÜBST, M.; DAHL, E. ITIH5, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. **Cancer Lett.**, v. 204, n. 1, p. 69–77, 2004.

HOLZER, H.; HEINRICH, P. Control of proteolysis. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 63–91, 1980.

IKEKITA, M.; JONE, C. S.; KAMO, M.; TSUGITA, A.; KIZUKI, K.; MORIYA, H. Purification and characterization of the major cationic kallikrein inhibitor in bovine pituitary gland. **Protein Seq. Data Anal.**, v. 5, p. 7–11, 1992.

IRVING, J. A.; PIKE, R. N.; LESK, A. M.; WHISSTOCK, J. C. Phylogeny of the Serpin Superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. **Genome Res.**, v. 10, p. 1845–1864, 2000.

JANSON, J.; RYDEN, L. **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**. New York: Academic Press, 1989. 502 p.

JOHNSON, D.; TRAVIS, J. Inactivation of human α 1-proteinase inhibitor by thiol proteinases. **Biochemistry**, v.163, p. 639 – 664, 1977.

KASSELL, B. Bovine trypsin-kallikrein inhibitor (kunitz inhibitor, basic pancreatic trypsin inhibitor, polyvalent inhibitor from bovine organs). **Methods enzymol.**, v. 19, p. 844–852, 1970.

KHAN, A. R.; JAMES, M. N. G. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. **Protein Sci.**, v. 7, p. 815–836, 1998.

KING, A. E.; MORGAN, K.; SALLENAVE, J. M.; KELLY, R. W. Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 310, p. 594–599, 2003.

KINGSTON, I. B.; ANDERSON, S. Sequences encoding two trypsin inhibitors occur in strikingly similar genomic environments. **Biochem. J.**, v. 233, p. 443–450, 1986.

KISSELEV, A. F.; SONGYANG, Z.; GOLDBERG, A. L. Why does threonine, and not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? **Biol. Chem.**, v. 275, n. 20, p. 1483–14837, 2000.

KOLARICH, D.; TURECEK, P. L.; WEBER, A.; MITTERER, ARTUR.; GRANINGER, M.; MATTHIESSEN, P.; NICOLAES, G. A. F.; ALTMANN, F.; SCHWARZ, H. P. Biochemical, molecular characterization, and glycoproteomic analyses of α 1-proteinase inhibitor products used for replacement therapy. **Transfusion**, v. 46, p. 1959–1977, 2006.

KUBRUSLY, F.S.; IOURTOV, D.; LEME, E.; RAW, I. Pulmonary surfactant protein A isolation as a by-product of porcine pulmonary surfactant production. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 40, p. 173–179, 2004.

KUNITZ, M.; NORTHROP, J. H. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. **J. Gen. Physiol.**, v. 19, p. 991–1007, 1936.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LASKOWSKI, M JR. Protein inhibitors of serine proteinases – mechanism and classification. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 199, p. 1–17, 1986.

LASKOWSKI, M JR.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 593–626, 1980.

LASKOWSKI, M JR.; KATO, I.; KOHR, W. J.; PARK, S. J.; TASHIRO, M.; WHATLEY, H. E.; Positive Darwinian selection in evolution of protein inhibitors of serine proteinases. **Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.**, v. 2, p. 545–553, 1987.

LAW, R. H.; ZHANG, Q. MCGOWAN, S.; BUCKLE, A. M.; SILVERMAN, G. A.; WONG, W.; ROSADO, C. J.; LANGENDORF, C. G.; PIKE, R. N.; BIRD, P. I.; WHISSTOCK, J. C. An overview of the serpin superfamily. **Genome Biol.**, v. 7, 216 doi:10.1186/gb-2006-7-5-216

LÊ, Q. T.; KATUNUMA, N. Detection of protease inhibitors by reverse zymography method, performed in a Tris (hydroxymethyl)aminomethane-tricine buffer system. **Anal. Biochem.**, v. 324, p. 237–240, 2004.

LOMAS, D. A.; MAHADEVA, R. α 1-Antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1585–1590, 2002.

LOWE, J.; STOCK, D.; JAP, B.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W.; HUBER, R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. **Science**, v. 268, n. 5210, p. 533–539, 1995.

LULL, M. E.; CARKACI-SALLI, N.; FREEMAN, W.M.; MYERS, J. L.; MIDGLEY, F.M; THOMAS, N. J.; KIMATIAN, S. J.; VRANA, K. E.; UNDA, A. Plasma biomarkers in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass. **Pediatr. Res.**, v. 63, n. 6, p. 638–644, 2008.

MA, G. E.; GREENWELL-WILD, T.; LEI, K.; JIN, W.; SWISHER, J.; HARDEGEN, N.; WILD, C. T. WAHL, S. M. Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 1337–1346, 2004.

MANGANO, D. T.; TUDOR, I. C.; DIETZEL, C. The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. **N. Engl. J. Med.**, v. 65, p. 354, 2006.

MARTIN, S. L.; DOWNEY, D.; BILTON, D.; KEOGAN, M. T., EDGAR, J.; ELBORN, J. S. Safety and efficacy of recombinant alpha(1)-antitrypsin therapy in cystic fibrosis. **Pediatr. Pulmonol.**, v. 41, p. 177–183, 2006.

MARTIN-VANDELET, N.; PARIS, S.; BOURGUIGNON, J.; SESBOÛÉ, R.; MARTIN, J. P.; DIARRA-MERPOUR, M. Assembly and secretion of recombinant chains of human inter-alpha-trypsin inhibitor in COS-7 cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 259, p. 476–484, 1999.

MATSUNO, Y. K.; NAKAMURA, H.; KAKEHI, K. Comparative studies on the analysis of urinary trypsin inhibitor (ulinastatin) preparations. **Electrophoresis**, v. 17, p. 2486–2494, 2006.

MATTES, E.; MATTHIESSEN, H. P.; TURECEK, P. L.; SCHWARZ, H. P. Preparation and properties of an alpha-1-proteinase inhibitor concentrate with high specific activity. **Vox Sang.**, v. 81, p. 29–36, 2001.

MCELVANEY, N. G.; DOUJAJI, B.; MOAN, M. J.; BURNHAM, M. R.; WU, M. C.; CRYSTAL, R. G. Pharmacokinetics of recombinant secretory leukoprotease inhibitor aerosolised to normals and individuals with cystic fibrosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 148, p. 1056–1060, 1993.

MCEVOY, M. D.; REEVES, S. T.; REVES, J. G. SPINALE, F. G. Aprotinin in Cardiac Surgery: A Review of Conventional and Novel Mechanisms of Action. **Anesth. Analg.**, v. 105, n. 4, p. 949–962, 2007.

MELLET, P.; ERMOLIEFF, J.; BIETH, J. G. Mapping the Heparin-Binding Site of Mucus Proteinase Inhibitor? **Biochemistry**, v. 34, p. 2645–2652, 1995.

MERCK index. 12.ed. Withehouse Station, 1996. p.980.

MERRIL, C. R. Gel staining techniques. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 477–478, 1990.

MICHALSKI, C.; PIVA, P.; BALDUYCK, M.; MIZON, C.; BURNOUF, T.; MIZON, J. Preparation and properties of a therapeutic inter-alpha-trypsin inhibitor concentrate from human plasma. **Vox Sang.**, v. 67, n. 4, p. 329–336, 1994.

MIZON, C.; HÉROM, A.; CAPON, C.; SAUTIERE, P.; MICHALSKI, C.; SESBOÛÉ, R.; MIZON, J. Human pre-alpha-inhibitor: isolation from a by-product of industrial scale plasma fractionation and structural analysis of its H3 heavy chain. **J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.**, v. 692, n. 2, p. 281–291, 1997.

MOREAU, T.; BARANGER, K.; DADÉ, S.; DALLET-CHOISY, S.; GUYOT, N.; ZANI, M. L. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. **Biochimie**, v. 90, p. 284–295, 2008.

MOUTON, R et al. Effect of aprotinin on renal dysfunction in patients undergoing on-pump and off -pump cardiac surgery: a retrospective observational study. **Lancet**, v. 371, p. 475–482, 2008.

MULGREW, A. T.; TAGGART, C. C.; MCELVANEY, N. G. Alpha-1-Antitrypsin deficiency: currents concepts. **Lung**, v. 185, n. 4, p. 191–201, 2007.

NATIONAL CENTER BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Blast 2 sequences**. Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>>. Acesso em: 27 Ago. 2007.

NATIONAL CENTER BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Clinical trials. Disponível em: < <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00005569>>. Acesso em: 15 de Jul. 2007.

NIE, J.; PEI, D. Rapid inactivation of alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil specific leukolysin/membrane-type matrix metalloproteinase 6. **Exp. Cell. Res.**, v. 296, n. 2, p. 145–50, 2004.

NORDENMAN, B.; BÜJORK, I. Influence of ionic strength and pH on the interaction between high-affinity heparin and antithrombin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 672, p. 227–238, 1981.

NUKIWA, T.; SUZUKI, T.; FUKUHARA, T.; KIKUCHI, T. Secretory leukocyte peptidase inhibitor and lung câncer. **Cancer Sci.**, v. 99, n. 5, p. 849–855, 2008.

OPAL, S. M.; LIM, Y. P.; SIRYAPORN, E.; MOLDAWER, L. L.; PRIBBLE, J. P.; PALARDY, J. E.; SOUZA, S. Longitudinal studies of inter-alpha inhibitor proteins in severely septic patients: a potential clinical marker and mediator of severe sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 35, n. 2, p. 634–635, 2007.

OTLEWSKI, J.; JELEN, F.; ZAKRZEWSKA, M.; OLEKSY, A. The many faces of protease – protein inhibitor interaction. **EMBO J.**, v. 24, n. 7, p. 1303–1310, 2005.

PAAKKO, P.; KIRBY, M.; DU BOIS, R. M.; GILLISSEN, A.; FERRANS, V.J.; CRYSTAL, R.G. Activated neutrophils secrete stored α_1 -antitrypsin. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 154, p. 1829–1833, 1996.

PANNELL, R.; JOHNSON, D.; TRAVIS, J. Isolation and properties of human plasma α -1-proteinase inhibitor. **Biochemistry**, v. 13, p. 5439–5445, 1974.

PETERSEN, L. C.; SPRECHER, C. A.; FOSTER, D. C.; BLUMBERG, H.; HAMAMOTO, T.; KISIEL, W. Inhibitory properties of a novel human kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. **Biochemistry**, v. 35, p.266–272, 1996.

PILLAI, B.; CHERNEY, M. M.; HIRAGA, K.; TAKADA, K.; ODA, K.; JAMES, M. N. Crystal structure of scytalidoglutamic peptidase with its first potent inhibitor provides insights into substrate specificity and catalysis. **J. Mol. Biol.**, v. 365, n. 2, p. 343–361, 2007.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 62, p. 2161–2172, 2005.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 270–272, 2006.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRET, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochem. J.**, v. 378, p. 705–716, 2004.

RAY, W. A. Learning from aprotinin - mandatory trials of comparative efficacy and safety needed. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, p. 840–842, 2008.

RAY, W. A.; STEIN, C. M. The Aprotinin Story - Is BART the Final Chapter? **N. Engl. J. Méd.**, v. 358, n. 22, p. 2398–2400, 2008.

REVISTA RURAL. Disponível em: < http://www.revistarural.com.br/edicoes/2007/Artigos/rev116_porco.htm>. Acesso em:13 Out. 2008.

RICE, W. G.; WEISS, S. J. Regulation of proteolysis at the neutrophil–substrate interface by secretory leukoprotease inhibitor. **Science**, v. 249, p. 178–181, 1990.

ROYSTON, D.; VAN HAAFTEN, N.; DE VOOCHT, P. Aprotinin: friend or foe? A review of recent medical literature. **Eur. J. Anaesthesiol.**, v. 24, p. 6–14, 2007.

RUSSI, E. W. Alpha-1 antitrypsin: now available, but we need it? **Swiss Med. Wkly**, v. 138, n. 13–14, p. 191–196, 2008.

RZYCHON, M.; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. **Acta Biochim. Pol.**, v. 51, n. 4, p. 861–873, 2004.

SALIER, J. P.; ROUET, P.; RAGUENEZ, G.; DAVEAU, M. The inter- α -inhibitor family: from structure to regulation. **Biochem. J.**, v. 315, p. 1–9, 1996.

SALLENAVE, J-M. Proteases and anti-proteases: Molecular Mechanisms and novel therapeutic targets. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, p. 112–115, 2002.

SALLENAVE, J-M. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase specific-inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteases in inflammatory lung disease. **Respir. Res.**, v. 1, p. 87–92, 2000.

SALLENAVE, J-M; RYLE, P. Purification and characterization of elastase specific-inhibitor. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v. 372, p. 13–21, 1991.

SAMBROOK J.; GETHING M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**, v. 342, p. 224–225, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Sci. USA**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SCHAGGER, A.; JAGOW, V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166, p. 368–379, 1987.

SCHALKWIJK, J.; WIEDOW, O.; HIROSE, S. The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and C-terminal four-disulphide core. **Biochem. J.**, v. 340, p. 569–577, 1999.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 1987.

SEEMÜLLER, U.; ARNHOLD, M.; FRITZ, H.; WIEDENMANN, K.; MACHLEIDT, W.; HEINZEL, R.; APPELHANS, H.; GASSEN, H. G.; LOTTSPEICH, F. The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor. **FEBS Lett.**, v. 199, p. 43–48, 1986.

SHUGARS, D. C. Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 431–435, 1999.

SIEKMANN, J.; WENZEL, H. R.; SCHRÖDER, W.; TSCHESCHE, H. Characterization and sequence determination of six aprotinin homologues from bovine lungs. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 369, p. 157–163, 1988.

SILVERMAN, G. A.; BIRD, P. I.; CARRELL, R. W.; CHURCH, F. C.; COUGHLIN, P. B.; GETTINS, P. G. W.; IRWING, J. A.; LOMAS, A. D.; LUKE, C. J.; MOYER, R.W.; PEMBERTON, P. A.; DONNELL, E. R.; SALVESEN, G. S.; TRAVIS, J.; WHISSTOCK, J. C. The Serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 36, p. 33293–33296, 2001.

SMITH, P. K.; DATTA, S. K.; MUHLBAIER, L. H.; SAMSA, G.; NADEL, A.; LIPSCOMB, J. Cost analysis of aprotinin for coronary artery bypass patients: analysis of the randomized trials. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 77, p. 635–643, 2004.

SONG, X.; ZENG, L.; JIN, W.; THOMPSON, J.; MIZEL, D. E.; LEI, K.; BILLINGHURST, R. C.; POOLE, A. R.; WAHL, S. M. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 190, n. 4, p. 535–542, 1999.

STALLINGS-MANN, M. L.; BURKE, M. G.; TROUT, W. E.; ROBERTS, R. M. Purification, characterization, and cDNA cloning of a Kunitz-type proteinase inhibitor secreted by the porcine uterus. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 39, p. 24090–24094, 1994.

STETLER, G.; BREWER, M. T.; THOMPSON, R. C. Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases. **Nucleic Acids Res.**, v. 14, n. 20, 7883–7896 1986.

TAGGART, C.; CERVANTES-LAUREAN, D.; KIM, G.; MCELVANEY, N. G.; WEHR, N.; MOSS, J.; LEVINE, R. L. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in a1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 27258–27265, 2000.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350–4354, 1979.

TSUJIMURA, S.; SAITO, K.; NAKAYAMADA, S.; TANAKA, Y. Bolus of human urinary trypsin inhibitors improves intractable interstitial pneumonia in patients with connective tissue diseases. **Reumatology**, v. 47, p. 907–913, 2008.

TSUNEMI, M.; MATSURA, Y.; SAKAKIBARA, S.; KATSUBE, Y. Crystal structure of an elastase specific inhibitor complexed with porcine pancreatic elastase determined at 1.9 Å resolution. **Biochem. J.**, v. 35, p. 11570–11576, 1996.

UEMURA, K.; MURAKAMI, Y.; HAYASHIDANI, Y.; SUDO, T.; HASHIMOTO, Y.; OHGE, H.; SUEDA, T. Randomized clinical trial to assess the efficacy of ulinastatin for postoperative pancreatitis following pancreaticoduodenectomy. **J. Surg. Oncol.**, 2008. In press.

VAN GENT, D.; SHARP, P.; MORGAN, K.; KALSHEKER, N. Serpins: structure, function and molecular evolution. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.35, p.1536–1547, 2003.

VERMA, R. P; HANSCH, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q) SARs. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, n. 6, p. 2223–2268, 2007.

VISSERS, M. C.; GEORGE, P. M.; BATHURST, I. C.; BRENNAN, S. O.; WINTERBOURN, C. C. Cleavage and inactivation of alpha 1-antitrypsin by metalloproteinases released from neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 82, p. 706–771, 1988.

VOGELMEIER, C.; BIEDERMANN, T.; MAIER, K.; MAZUR, G.; BEHR, J.; KROMBACH, F.; BUHL, R. Comparative loss of activity of recombinant secretory leukoprotease inhibitor and α 1-protease inhibitor caused by different forms of oxidative stress. **Eur. Respir. J.**, v. 10, p. 2114–2119, 1997.

VOGELMEIER, C.; GILLISSEN, A.; BUHL, R. Use of secretory leukoprotease inhibitor to augment lung antineutrophil activity. **Chest**, v. 110, p. 261–266, 1996.

WELDON, S.; MCGARRY, N.; TAGGART, C. C.; MCELVANEY, N. G. The role of secretory leucoprotease inhibitor in the resolution of inflammatory responses. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 273–276, 2007.

WESTABY, S. Aprotinin: Twenty-five years of claim and counterclaim. **Thorac Cardiovasc. Surg.**, v. 135, p. 487–491, 2008.

WIEDOW, O.; SCHRODER, J. M.; GREGORY, H. YOUNG, J. A.; CHRISTOPHERS, E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 14791–14795, 1990.

WILLIAMS, S. E.; BROWN, T. I.; ROGHANIAN, A.; SALLENAVE, J-M. SLPI and elafin: one glove, many fingers. **Clin. Sci.**, v. 110, p. 21–35, 2006.

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. **Trypsin assay**. Disponível em: <<http://www.worthington-biochem.com/TRY/assay.html>>. Acesso em: 15 Mar. 2004.

XU, Y.; CARR, P.D.; GUSS, J.M.; OLLIS, D.L. The crystal structure of bikunin from the inter- α -inhibitor complex: a serine protease inhibitor with two Kunitz domains. **J. Mol. Biol.**, v. 276, n. 5, p. 955–966, 1998.

YANG, L.; RESNICK, M. I.; MARENGO, S. R. A simple procedure for isolating microgram quantities of biologically active bikunin from human urine. **BJU Int.**, v. 96, n. 4, p. 647–653, 2005.

ZHUO, L.; HASCALL, V. C.; KIMATA, K. Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 37, p. 38079–38082, 2004.

ZITNIK, R. J.; ZHANG, J.; KASHEM, M. A.; KOHNO, T.; LYONS, D. E.; WRIGHT, C. D.; ROSEN, E.; GOLDBERG, I.; HAYDAY, A. C. The cloning and characterization of a murine

secretory leukocyte protease inhibitor cDNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 232, p. 687– 697, 1997.

ZUPUNSKI, V.; KORDIS, D.; GUBENSEK, F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. **FEBS Lett.**, v. 547, p. 131 – 136, 2003.

ANEXO A
TRABALHO PUBLICADO

Purification and characterization of aprotinin from porcine lungs

Sandra de Cássia Dias · Dirce Sakauchi · Patrícia Antonia Estima Abreu · Solange de Lima Netto · Dmitri Iourtov · Isaias Raw · Flávia Saldanha Kubrusly

Received: 19 September 2007 / Revised: 27 November 2007 / Accepted: 27 November 2007 / Published online: 11 December 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Aprotinin, the most studied serine proteinase inhibitor, was isolated from porcine lung for the first time. The purified porcine aprotinin had an Mr value of ~7 kDa. It cross-reacted with polyclonal serum anti-commercial aprotinin. About 1 µg porcine aprotinin inhibited 6 µg trypsin whereas 1 µg commercial soybean inhibitor inhibited only 1 µg trypsin. The aprotinin gene was also isolated from porcine lung: the deduced amino acid sequence showed 74% identity to bovine aprotinin.

Keywords Aprotinin · BPTI · Kallikrein inactivator · Kunitz inhibitor · Porcine aprotinin · Porcine lungs

Introduction

Aprotinin or basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI), also referred to as bovine pancreatic trypsin inhibitor, is one of the most widely studied members of the Kunitz family of inhibitors (Fritz and Wunderer 1983; Laskowski and Kato 1980). Aprotinin inhibits serine proteinases such as trypsin, chymotrypsin, plasmin and kallikrein. Aprotinin from bovine lungs inactivates kallikrein and is used commercially as a therapeutic agent, Trasylol (Fritz and Wunderer 1983). Although many papers have reported on the biochemical, structural and functional properties of this inhibitor, some questions remain. For example, is aprotinin expression restricted to ruminants (Laskowski and Kato 1980). If not, it may have a possible function in the lungs, initially proposed to be bovine, which would be the protection of the lung elastic tissue from leukocytic elastase activity (Businaro et al. 1988). It could also support the morphologic, structural and functional similarities of terrestrial mammal lungs (Foot et al. 2006). Therefore, since we have been working with porcine lungs for purification of molecules to be used as reagents or therapeutic drugs (Kubrusly et al. 2000, 2004), we have focused on the isolation of aprotinin from this material and report our findings in this paper.

S. de Cássia Dias · D. Sakauchi ·
P. A. E. Abreu · D. Iourtov · I. Raw · F. S. Kubrusly (✉)
Centro de Biotecnologia, Avenida Vital Brasil, 1500,
05503-900 Sao Paulo, SP, Brazil
e-mail: kubruslyfs@butantan.gov.br

S. de Cássia Dias · D. Sakauchi
Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São
Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730,
05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil

D. Sakauchi
Serviço de Controle de Qualidade, Avenida Vital Brasil,
1500, 05503-900 Sao Paulo, SP, Brazil

S. de Lima Netto
Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan,
Avenida Vital Brasil, 1500, 05503-900 Sao Paulo, SP,
Brazil

Materials and methods

Purification of aprotinin from porcine lungs

Frozen bovine and porcine lungs were ground and processed according to Kassell (1970) with the following modifications: the addition of 0.6 mM PMSF in the buffer extraction and the replacement of Celite 545 by Cell Debris Remover (CDR) (Sigma).

Procedure 1

The active bovine and porcine supernatants (pH 7.8) were applied to a trypsin-agarose column (Sigma). The column was equilibrated with 0.1 M Tris/HCl plus 0.15 M NaCl pH 8.0 (3–5 volumes). 0.01 M HCl was used for elution and 1 M NaOH for pH adjustment to 7.8.

Procedure 2

The active porcine supernatant (pH 7.8) was also concentrated by tangential flow filtration using regenerated cellulose membranes with a nominal pore size of 10 kDa. The filtrate was submitted to the same affinity chromatography procedures described in procedure 1.

Procedure 3

The active porcine supernatant (pH 7.8) was also applied to a Hi Prep 26/10 Desalting column (GE Healthcare). This column was equilibrated and eluted with 0.01 M Tris/HCl plus 0.05 M NaCl pH 7.0 (buffer A). The first desalted peak was pooled and applied to 5 ml columns of Sepharose SP FF cation exchange followed by Sepharose Q FF anion-exchange (GE Healthcare). The columns were connected in series and equilibrated with buffer A. After loading, the columns were disconnected and the bound proteins were eluted from the columns with buffer A plus 0.3 M NaCl (B) and buffer A plus 1 M NaCl (C). The eluted fractions from both columns were collected and assayed for the enzymatic inhibition and then applied to the affinity column. The

affinity column was equilibrated with 0.01 M Tris/HCl plus 0.3 M NaCl pH 7.8 (3–5 volumes). After the column equilibration the procedures were the same described in procedure 1.

Protein assays

Protein determination

BCA protein assay kit (Pierce Chemical) was used to measure total protein.

Gel electrophoresis

Protein samples were separated by 15% (v/v) SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue or silver nitrate.

Western blotting

The protein samples were resolved by SDS-PAGE (15%) under reducing conditions and electroblotted from gel to the polyvinylidene difluoride membrane. Rabbit polyclonal serum anti-aprotinin was used to reveal the presence of the porcine aprotinin.

Enzymatic assay

The antitryptic activity was monitored at 405 nm following the tryptic hydrolysis of *N*- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) in the presence of the inhibitor (Kassell 1970). The assay was performed in 300 μ l held in 96-microwell plates. Inhibitory activity was expressed in terms of inhibitory unit (IU), where 1 IU was arbitrarily defined as the amount of protein sample required to inhibit 1 μ g trypsin.

Reverse zymography

Samples underwent electrophoresis in polyacrilamide gels containing 1 mg gelatin/ml in the presence of SDS under non-reducing conditions. After electrophoresis, gels were washed in 2.5% Triton X-100 (v/v) and

incubated at 37°C for 2 h in 0.01 M Tris/HCl containing 0.2 M NaCl, 0.01 M CaCl₂ pH 7.6 plus trypsin (15 µg/ml). The gels were then stained with Coomassie Blue.

DNA extraction and PCR analysis

Genomic DNA was extracted from bovine and porcine lung with a guanidine-detergent lysing solution (DNAzol Reagent, Invitrogen) according to the manufacturer's manual.

The PCR primers of BPTI gene were synthesized based on the sequence of bovine BPTI (Kingston and Anderson 1986). The sequence of forward primer was 5'-CGG CCT GAC TTC TGC CTA GA-3' and the reverse primer was 5'-AGC ACC ACC ACA GGT CCT CA-3'. The PCR fragments (approx 174 bp) were purified using a Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's manual and cloned into the pGEM-T Easy cloning vector (Promega). The products were sequenced with the primers M13F (5'-GTTTCCCAGTCACGA) and M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC) on ABI Prism 377 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Nucleotide and deduced amino acid sequences were analyzed using Specialized BLAST Local

Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) and multiple sequence alignment was performed with Clustal W program (Higgins et al. 1994) (URL: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Results and discussion

The purification methodology to obtain aprotinin from porcine lungs is outlined in Fig. 1. Initially, the methodology was based on the extreme resistance of the bovine aprotinin to acidic conditions (Kassell 1970). Pure bovine aprotinin was obtained from fraction 5 of the trypsin-resin (procedure 1). SDS-PAGE and Western blotting analysis confirmed the bovine aprotinin purity and identity (data not shown). The trypsin inhibitory specific activity of bovine aprotinin (fraction 5) was six times higher when compared with the soybean inhibitor. For porcine lung active supernatant, the SDS-PAGE and Western blotting analysis of the active trypsin-resin fractions presented possible inhibitors including two with molecular mass above 10 kDa also detected in the reverse zymograms (data not shown). In order to eliminate high molecular mass inhibitors as we were looking for aprotinin (around 7 kDa), we introduced a 10 kDa tangential flow filtration step. The affinity

Fig. 1 Flowchart of the bovine and porcine aprotinin purification protocols. Three procedures were described using active porcine lung supernatant

fraction of 10 kDa filtrate had a tryptic inhibitory specific activity around 0.95 comparable to soybean inhibitor (= 1) (procedure 2), but its SDS-PAGE profile showed four distinct bands beneath 30 kDa, two of these bands were around 20 kDa. The reverse zymogram showed only one band around 20 kDa, but its western blotting analysis using rabbit antibody against commercial aprotinin revealed two very faint bands around 10 kDa and around 50 kDa (data not shown).

As these results were not conclusive, we tested other protocols before assuming that aprotinin would be present only in ruminants as suggested by Laskowski and Kato (1980). In the next trial, procedure 3, our intention was to recover aprotinin (pI around 10) and other cations which bounded to Sepharose-SP and the anions which bounded to Sepharose-Q. The 0.3 M NaCl fractions eluted from Sepharose-SP was pretty active as we expected, however, we also submitted the 0.3 M NaCl fractions from Sepharose-Q to affinity chromatography. Yang et al. (2005), who had different interests, kept the fractions eluted from Sepharose-Q due to their intention to purify another trypsin inhibitor, bikunin (pI 5.6), and discard the cations bounded to Sepharose-SP.

The affinity column fractions 5 and 6 from both separations presented the best antitryptic activity results (Figs. 2a,b). However, pure porcine aprotinin was detected and confirmed only in fractions 5 and 6 from Sepharose-Q (Figs. 3b, lane 4; 3C, lane 4; 3D, lane 2). Ikekita et al. (1992) purified aprotinin in the bovine pituitary gland also using one anion exchange fraction. The reverse zymogram of this sample (Fig. 3c, lane 4) presented only one inhibitor which

had the same molecular mass as commercial bovine aprotinin (Fig. 3c, lane 2). Reverse zymography techniques are effective tools for isolating and characterizing natural protease inhibitors by detecting the activity of an individual protein (Le and Katunuma 2004).

Affinity fractions 5 and 6 from Sepharose-SP showed three bands, one of them was aprotinin (Figs. 3a, lane 5; 3D, lane 1). The reverse zymogram of this sample also showed another probable trypsin inhibitor of molecular mass ~ 14 kDa (Fig. 3c, lane 5), which was not recognized by the anti-bovine lung aprotinin (Fig. 3d, lane 1). (We are now investigating this other protease inhibitor.)

We extracted total genomic DNA from bovine and porcine lungs to identify aprotinin gene in both species (Figs. 4a,b) and deduced the porcine amino acid sequence (Fig. 4c). Our results showed 74% identities (Figs. 4b,c). Among the identities, we observed the match of residues in the reactive site (P1), the lysine at the 15th residue, followed by alanine (16th position), and the match up of the six cysteines (Fig. 4c), supporting the high homology between bovine and porcine aprotinin (Fritz and Wunderer 1983).

The purification of aprotinin from porcine lungs was achieved thereby demonstrating that aprotinin is not restricted to ruminants. The ability to investigate the inhibitor occurrence in all mammal lungs is an important consideration not only related to the biochemical, structural and functional properties, including the inhibitor genetic evolution (Laskowski et al. 1987), but also to help define its role in lung physiology (Foot et al. 2006). The biotechnological relevancy of our data is also to present an alternative

Fig. 2 Chromatographic profiles and associated trypsin inhibition results of the affinity column fractions which were obtained from the samples 0.3 M NaCl from Sepharose-SP (a)

and from Sepharose-Q (b). Each affinity fraction corresponded to 1.5 ml of the eluate. (●) protein concentration (μg/ml), (▲) trypsin inhibition (IU/μg)

Fig. 3 Characterization of porcine lung aprotinin. (a) and (b)—15% (v/v) SDS-PAGE (5 μ g protein/lane). (a) Lanes: 1, molecular weight markers; 2, fraction 0.3 M NaCl from Sepharose-SP; 3, fraction 3 from affinity column; 4, fraction 4 from affinity column; 5, pool of fractions 5 and 6 from affinity column. (b) Lanes: 1, molecular weight markers; 2, fraction 0.3 M NaCl from Sepharose-Q; 3, fraction 4 from affinity column; 4, pool of fractions 5 and 6 from affinity column. (c) Reverse Zymography—(1 μ g protein/lane) Lanes: 1,

soybean inhibitor; 2, commercial bovine aprotinin; 3, $\emptyset$; 4, pool of fractions 5 and 6 from affinity column obtained from Sepharose-Q; 5, pool of fractions 5 and 6 from affinity column obtained from Sepharose-SP. (d) Western blotting—(10 μ g protein/lane) Lanes: 1, pool of fractions 5 and 6 from affinity column obtained from Sepharose-SP; 2, pool of fractions 5 and 6 from affinity column obtained from Sepharose-Q; 3, $\emptyset$; 4, commercial bovine aprotinin

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequence of porcine lung aprotinin. (a) PCR products of bovine and porcine lung DNA samples—Lanes: 1, molecular weight markers, 2, bovine lung PCR; 3, porcine lung PCR. (b) Comparison of nucleotide sequences of bovine aprotinin and porcine aprotinin genes (174 bp). The homologous regions are highlighted in the shaded boxes. 1, bovine sequence of lung

aprotinin gene; 2, porcine sequence of lung aprotinin gene. (c) Comparison of the amino acid sequence of bovine aprotinin and the deduced amino acid sequence of the porcine aprotinin. Identities were highlighted with box shade. 1, bovine aprotinin amino acid sequence; 2, deduced porcine aprotinin amino acid sequence

raw material (porcine lungs) for the purification of aprotinin which is particularly convenient for our group as we have been working with porcine lungs to purify molecules for therapeutic and reagent uses. Nowadays, aprotinin, obtained from bovine lungs and its recombinant form expressed in plants (corn, tobacco), is commercially available as reagents to avoid undesirable proteolysis, but only the aprotinin extracted from bovine lungs has been used since the late 1980s to reduce blood loss and preserve platelet

function by plasmin inhibition and/or by other platelet agonists during cardiac surgery (Royston et al. 2007). Further studies are necessary to analyse the safety and efficacy of porcine aprotinin in clinical trials.

Acknowledgments The authors are in debt to Mr. Leo Setsuo Kobashi for his technical assistance. This work was supported by grants and scholarships from Brazilian agencies: CNPq, FAPESP, Capes/MEC and by Butantan Foundation and Sadia.

References

- Businaro R, Fioretti E, Fumagalli L, Citro G, Renzis G, Ascoli F (1988) Cellular localization of bovine pancreatic trypsin inhibitor and related molecular forms in bovine lung. *Histochem J* 20:187–193
- Foot NJ, Orgeig S, Daniels CB (2006) The evolution of a physiological system: the pulmonary surfactant system in diving mammals. *Respir Physiol Neurobiol* 154:118–138
- Fritz H, Wunderer G (1983) Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 33:479–494
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Ikekita M, Jones CS, Kamo M, Tsugita A, Kizuki K, Moriya H (1992) Purification and characterization of the major cationic kallikrein inhibitor in bovine pituitary gland. *Protein Seq Data Anal* 5:7–11
- Kassell B (1970) Bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz-inhibitor, basic pancreatic trypsin inhibitor, polyvalent inhibitor from bovine organs). *Methods Enzymol* 19:844–852
- Kingston IB, Anderson S (1986) Sequences encoding two trypsin inhibitors occur in strikingly similar genomic environments. *Biochem J* 233:443–450
- Kubrusly FS, Iourtov D, Leme E, Raw I (2004) Pulmonary surfactant protein A isolation as a by-product of porcine pulmonary surfactant production. *Biotechnol Appl Biochem* 40:173–179
- Kubrusly FS, Netto SL, Iourtov D, Raw I, Araujo PS (2000) A natural pig lung surfactant. *Biotechnol Lett* 22:1251–1253
- Laskowski M Jr, Kato I (1980) Proteins inhibitors of Proteinases. *Ann Rev Biochem* 49:593–626
- Laskowski M Jr, Kato I, Kohr WJ, Park SJ, Tashiro M, Whatley HE (1987) Positive Darwinian selection in evolution of protein inhibitors of serine proteinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 52:545–553
- Le QL, Katunuma N (2004) Detection of protease inhibitors by a reverse zymography method, performed in a tris(hydroxymethyl)aminomethane-Tricine buffer system. *Anal Biochem* 324:237–240
- Royston D, van Haaften N, De Vooght P (2007) Aprotinin: friend or foe? A review of recent medical literature. *Eur J Anaesthesiol* 24:6–14
- Yang L, Resnick MI, Marengo SR (2005) A simple procedure for isolating microgram quantities of biologically active bikunin from human urine. *Br J Urol* 96:647–653