

Tânia Lúcia Santos Miranda

ESTUDOS COM A CALICREÍNA URINÁRIA HUMANA

- A - UM NOVO MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DA ENZIMA EM LARGA ESCALA.
- B - CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA COM SUBSTRATOS SINTÉTICOS DOS TIPOS AMIDA E ÉSTER, DERIVADOS DA ARGININA  $N\alpha$ -SUBSTITUÍDA E COM OS INIBIDORES APROTININA E BENZAMIDINA.

Tese submetida ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Belo Horizonte  
Minas Gerais - Brasil  
(Agosto de 1995)

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro das seguintes agências financiadoras:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Plano de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT/Biotecnologia);
- Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq/UFMG);

Dedico afetosamente este trabalho ao Rafael e aos meus filhos Artur e Mariana.

## AGRADECIMENTOS

Para realização deste trabalho, contei com a inestimável colaboração de várias pessoas, às quais dedico os mais profundos agradecimentos. Em especial, tenho muito a agradecer:

Ao Professor Dr. Amintas Fabiano de Sousa Figueiredo, pela orientação, apoio e amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Marcelo Matos Santoro, pela disponibilidade e pela colaboração nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao Professor Dr. Edyr Rogana, pela amizade e gentil colaboração na análise dos dados cinéticos.

Ao colega, Antero Silva Ribeiro de Andrade pela realização das cromatografias em HPLC.

Aos estudantes de Iniciação Científica do CNPq, Carlos Henrique Inácio Ramos, Rodrigo Teixeira Santos Freire e Elizângela Pereira de Souza, pela participação em alguns experimentos.

Às amigas e colegas, Marinez de Oliveira Sousa, Cibele Rodrigues Veloso e Roseli Aparecida da Silva Gomes, pelo carinho, companheirismo e apoio, presentes ao longo desta jornada.

Ao colega José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva pela paciência e colaboração na utilização dos computadores.

Aos colegas, Vanderley, Janete, Rosemary, Jamil, Leonardo, Carlos Henrique, Nelder, Márcio e Maria Lúcia, pela amizade, apoio e troca de idéias.

À Kátia Barroso Gonçalves, pela paciência e apoio, mas sobretudo pela amizade.

À secretária do Curso de Pós-Graduação, Celise F. Costa, pelo apoio e atenção sempre dispensados.

À bibliotecária, Maria Cecília de Souza Lima, pela atenção e disponibilidade.

Finalmente, quero expressar meus melhores agradecimentos a todos aqueles que contribuíram com este trabalho, seja através de auxílios diretos ou indiretos, sugestões, ou simplesmente dando seu estímulo e sua confiança.

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	011
Lista de tabelas.....	014
I - INTRODUÇÃO.....	016
Objetivo geral.....	029
Objetivos específicos.....	030
II - METODOLOGIA.....	031
II.1. Concentração da urina humana.....	031
II.1.1. Coleta da urina.....	031
II.1.2. Precipitação isoelétrica da glicoproteína de Tamm Horsfall.....	031
II.1.3. Concentração da calicreína urinária humana com o gel poli(N-isopropilacrilamida).....	032
II.1.4. Diálise e liofilização.....	034
II.2. Purificação da calicreína urinária humana.....	034
II.2.1. Preparação do extrato bruto.....	034
II.2.2. Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose- aprotinina.....	035
II.3. Métodos analíticos.....	036
II.3.1. Dosagem de proteínas.....	036
II.3.2. Medida da atividade amidásica.....	037
II.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	039
II.3.4. Cromatografia de fase reversa em HPLC.....	043
II.3.5. Cromatografia de troca iônica em HPLC.....	044

II.4. Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana .....	044
II.4.1. Determinação do peso molecular aparente por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-mercaptoetanol.....	044
II.4.2. Determinação do peso molecular aparente por cromatografia de exclusão molecular.....	045
II.4.3. Determinação do peso molecular por titulação com aprotinina.....	046
II.5. Caracterização cinética da calicreína urinária humana .....	046
II.5.1. Titulação do centro ativo da calicreína urinária humana.....	046
II.5.2. Cinética de hidrólise dos substratos sintéticos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan.....	050
II.5.2.1. Efeito do pH sobre as velocidades de hidrólise dos substratos sintéticos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana .....	050
II.5.2.2. Efeito do tempo de incubação sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana .....	051
II.5.2.3. Efeito da variação da concentração de substrato sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana .....	052

II.5.3. Cinética da hidrólise dos substratos sintéticos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe .....	053
II.5.3.1. Determinação dos coeficientes de extinção molar ( $\epsilon_M$ ) do Bz-Arg-OEt, benzoil-L-arginina (Bz-Arg), Tos-Arg-OMe e N $\alpha$ -p-toluenosulfonil-L-arginina (Tos-Arg).....	053
II.5.3.2. Efeito do pH sobre as velocidades de hidrólise dos substratos sintéticos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe, catalisadas pela calicreína urinária humana .....	054
II.5.3.3. Efeito do tempo de incubação sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg- OMe catalisadas pela calicreína urinária humana	055
II.5.3.4. Efeito da variação da concentração de substrato sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe catalisadas pela calicreína urinária humana.....	056
II.5.4. Estudos de inibição da atividade esterásica da calicreína urinária humana .....	058
II.5.4.1. Estudo dos efeitos de Bz-Arg e etanol sobre a atividade esterásica da calicreína urinária humana com o substrato Bz-Arg-OEt .....	058
II.5.5. Estudos da inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana .....	059
II.5.5.1. Estudos da inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana pela aprotinina .....	059
II.5.5.2. Estudos da inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana pela benzamidina ...	060

II.5.6. Determinação dos parâmetros cinéticos para as hidrólises de substratos sintéticos catalisadas pela calicreína urinária humana .....	062
III - RESULTADOS .....	064
III.1. Purificação da calicreína urinária humana .....	064
III.2. Critérios de pureza.....	069
III.3. Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-mercaptoetanol .....	074
III.4. Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana por cromatografia de exclusão molecular .....	074
III.5. Determinação da concentração molar de calicreína urinária humana ativa .....	075
III.6. Caracterização cinética da calicreína urinária humana.....	080
III.6.1. Cinética da hidrólise de substratos do tipo 4-nitroanilida .....	080
III.6.1.1. Cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan .....	080
III.6.1.2. Cinética da hidrólise do substrato Ac-Phe-Arg-Nan .....	085
III.6.2. Cinética da hidrólise dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe catalisada pela calicreína urinária humana .....	094

III.6.2.1. Determinação dos coeficientes de extinção molar da benzoil-L-arginina (Bz-Arg), do Bz-Arg-OEt da tosil-L-arginina (Tos-Arg) e do Tos-Arg-OMe...	094
III.6.2.2. Cinética da hidrólise do substrato Bz-Arg-OEt ...	094
III.6.2.3. Cinética da hidrólise do substrato Tos-Arg-OMe ..	098
III.7. Estudos de inibição das atividades amidásica e esterásica da calicreína urinária humana .....	103
III.7.1. Efeitos do etanol e da benzoil-L-arginina sobre a atividade esterásica da calicreína urinária humana com o substrato Bz-Arg-OEt .....	103
III.7.2. Inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana .....	103
III.7.2.1. Inibição pela aprotinina da atividade amidásica da calicreína urinária humana com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan .....	103
III.7.2.2. Inibição pela benzamidina da atividade amidásica da calicreína urinária humana com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan.....	115
IV - DISCUSSÃO .....	123
IV.1. Concentração da calicreína na urina humana.....	123
IV.1.1. Precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall.....	123
IV.1.2. Concentração da calicreína na urina humana .....	124
IV.2. Purificação da calicreína urinária humana .....	124
IV.3. Critérios de pureza e valores de pesos moleculares ...	126
IV.4. Caracterização cinética da calicreína urinária humana	130
IV.4.1. Parâmetros cinéticos com substratos sintéticos .....	130

IV.5. Inibição das atividades amidásica e esterásica da calicreína urinária humana .....	138
IV.5.1. Inibição da atividade esterásica da calicreína urinária humana pelo excesso dos substratos.....	138
IV.5.2. Inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana .....	140
IV.5.2.1. Inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana por aprotinina .....	140
IV.5.2.2. Inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana por benzamidina .....	144
V - CONCLUSÕES .....	147
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	149

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01 - Hidrólise enzimática do cininogênio com liberação de bradicinina (Bk) e calidina (Lys-Bk) 017
- FIGURA 02 - Representação do processo de concentração de macromoléculas através da utilização de géis termosensíveis.....033
- FIGURA 03 - Representação esquemática do método gráfico proposto por DIXON (1972) para a determinação da concentração da enzima ativa ( $e_0$ ) e da constante de dissociação do complexo enzima-inibidor ( $K_i$ ).....049
- FIGURA 04 - Fluxograma esquemático da purificação da calicreína urinária humana.....065
- FIGURA 05 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina.....067
- FIGURA 06 - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-mercaptoetanol.....070
- FIGURA 07 - Cromatografia em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC.....071
- FIGURA 08 - Cromatografia de fase reversa em equipamento HPLC.....072
- FIGURA 09 - Cromatografia de troca iônica em equipamento HPLC.....073
- FIGURA 10 - Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-

mercaptoetanol.....	076
FIGURA 11 - Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana por filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC.....	077
FIGURA 12 - Gráficos de DIXON (1972) para a determinação da concentração da enzima ativa ( $e_0$ ) e $K_i$ aparente.....	079
FIGURA 13 - Efeito do pH sobre a velocidade de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana.....	088
FIGURA 14 - Determinação do efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana.....	089
FIGURA 15 - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana.....	090
FIGURA 16 - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Ac-Phe-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana.....	091
FIGURA 17 - Determinação do coeficiente de extinção molar do substrato Bz-Arg-OEt.....	096
FIGURA 18 - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-OEt catalisada pela calicreína urinária humana.....	100

- FIGURA 19 - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Tos-Arg-OMe catalisada pela calicreína urinária humana.....101
- FIGURA 20 - Gráficos de DIXON (1972) para a determinação da constante de dissociação ( $K_i$ ) do complexo calicreína-aprotinina.....107
- FIGURA 21 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana na ausência e na presença de cinco concentrações de aprotinina.....108
- FIGURA 22 - Gráfico das inclinações multiplicado por ( $V_{max}/K_s$ ) versus concentração de aprotinina.....109
- FIGURA 23 - Gráfico dos ajustes das inclinações x ( $V_{max}/K_s$ ) versus concentração de aprotinina para vários valores de  $K_i$  e  $K_{ii}$ .....113
- FIGURA 24 - A) Gráfico das velocidades residuais versus concentração de aprotinina.  
B) Gráfico dos resíduos.....114
- FIGURA 25 - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana na ausência e na presença de três concentrações de benzamidina 118
- FIGURA 26 - Gráfico de DIXON (1953) para a determinação da constante de dissociação ( $K_{ic}$ ) do complexo calicreína urinária humana-benzamidina.....120

FIGURA 27 - Gráfico de CORNISH-BOWDEN (1974) para a determinação da constante de dissociação ( $K_{iu}$ ) do complexo calicreína urinária humana-benzamidina.....121

FIGURA 28 - **A)** Gráfico das velocidades residuais versus concentração de D-Val-Leu-Arg-Nan na ausência e na presença de três concentrações de benzamidina obtido por ajuste dos dados experimentais à equação de velocidade descrita para a inibição mista.  
**B)** Gráfico dos resíduos versus concentração de D-Val-Leu-Arg-Nan.....122

#### LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Purificação da calicreína urinária humana, usando-se Ac-Phe-Arg-Nan como substrato para a medida da atividade amidásica.....068

Tabela 02 - Algumas propriedades físico-químicas da calicreína urinária humana.....078

TABELA 03 - Coeficientes da equação de velocidade obtidos por ajuste dos dados experimentais.....092

TABELA 04 - Constantes cinéticas para as hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-

Nan catalisadas pela calicreína urinária humana.....	093
TABELA 05 - Coeficientes de extinção molar ( $\epsilon_M$ ) para Bz-Arg-OEt, Bz-Arg, Tos-Arg-OMe e Tos-Arg em pH 3,5.....	097
TABELA 06 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise de substratos sintéticos catalisada pela calicreína urinária humana.....	102
TABELA 07 - Constantes de dissociação ( $K_{i\ app}$ ) para os complexos aprotinina-calicreína urinária humana.....	106
TABELA 08 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan (15-100 $\mu M$ ) catalisada pela calicreína urinária humana na presença de benzamidina.....	119
TABELA 09 - Processos de purificação e pesos moleculares citados na literatura para calicreína urinária humana.....	129
TABELA 10 - Comparação de algumas constantes cinéticas para a hidrólise de substratos sintéticos pela calicreína urinária humana.....	137

## I - INTRODUÇÃO

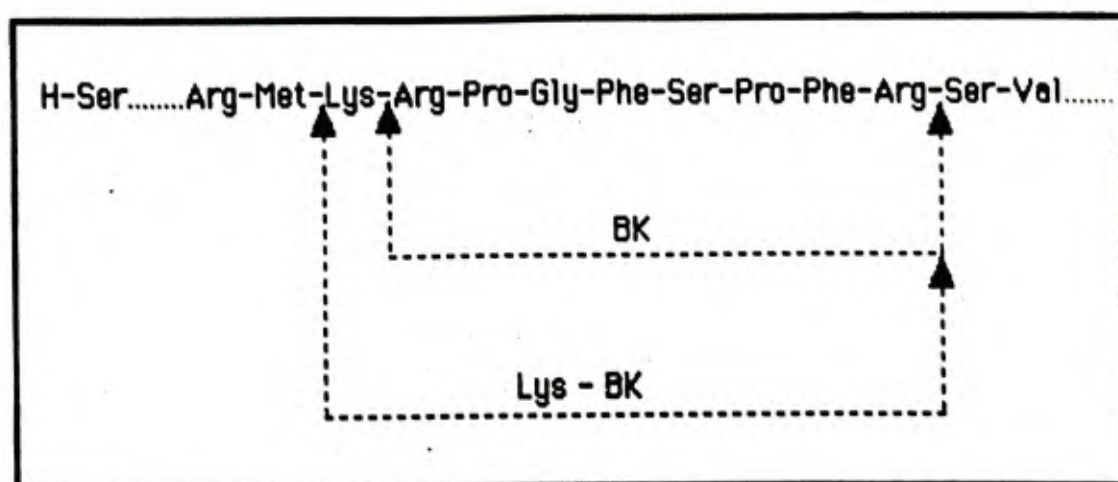
As calicreínas ou cininogenases (EC 3.4.21.8) são enzimas pertencentes ao grupo das serino-proteases, que se caracterizam pela presença de um resíduo de serina no centro ativo. Elas possuem atividade proteolítica específica e restrita e, além do seu substrato natural, os cininogênios, hidrolisam também substratos sintéticos dos tipos amida e éster, derivados da arginina N $\alpha$ -substituída (GEIGER & FRITZ, 1981).

A descoberta das calicreínas deu-se entre 1926 e 1928. FREY (1926) e FREY & KRAUT (1928) encontraram na urina humana uma substância não dializável e termolábil que, injetada por via intravenosa no cão, produzia o abaixamento da pressão arterial. Pensou-se inicialmente que essa substância era um hormônio excretado, com atividade sobre os vasos sanguíneos e a circulação. Essa hipótese só foi descartada quando WERLE et al. (1937) demonstraram que as calicreínas liberavam enzimaticamente, de um precursor inativo do plasma, uma substância que era capaz de provocar contrações em preparações de músculos isolados.

A partir de 1950, resultados de estudos sobre calicreínas, publicados na literatura, alteraram significativamente algumas das idéias mais antigas sobre elas. Assim, sabe-se atualmente, que a calicreína pancreática é originada no pâncreas e não no plasma, como se

pensava anteriormente, e que a fonte da caliceína urinária humana não é o pâncreas, mas, sim o próprio rim.

As caliceínas são classificadas em dois grupos, as plasmáticas (EC 3.4.21.34) e as glandulares ou tissulares (EC 3.4.21.35). Elas diferem entre si na origem de síntese, nas propriedades físico-químicas, tais como massa molecular, ponto isoelétrico, caráter imunológico, susceptibilidade a inibidores naturais e sintéticos, velocidade de reação com os substratos naturais (cininogênios) e sintéticos e a cinina liberada (BOTHWELL et al., 1979). As caliceínas plasmáticas hidrolisam, preferencialmente, o cininogênio de alto peso molecular, liberando bradicinina, enquanto que as tissulares hidrolisam preferencialmente o cininogênio de baixo peso molecular liberando (lisil-bradicinina) (MÜLLER-ESTERL et al., 1985). Os pontos de hidrólise do cininogênio para a liberação de bradicinina e calidina são mostrados, esquematicamente na Figura 1.



**FIGURA 1** - Hidrólise enzimática do cininogênio com liberação de bradicinina (Bk) e calidina (Lys-Bk).

Os cininogênios, moléculas precursoras das cininas, são proteínas sintetizadas no fígado e secretadas no plasma, linfa e fluidos intersticiais de mamíferos, após sofrerem modificações pós-traducionais, tal como glicosilação (KITAMURA et al., 1983).

O cininogênio plasmático ( $\alpha_2$ -globulina), no homem e na maioria dos mamíferos, ocorre sob duas formas, uma de alto peso molecular (88.000-114.000) e outra de baixo peso molecular (50.000-68.000) (MÜLLER-ESTERL et al., 1986). No entanto, no rato, além dessas duas formas há uma terceira, o T-cininogênio, apresentando um peso molecular de cerca de 69.000 (GREENBAUN & OKAMOTO, 1988).

Os cininogênios exercem pelo menos quatro funções biológicas distintas: 1) são substratos naturais das calicreínas e, portanto, precursores das cininas; 2) inibem cisteíno-proteases com alta afinidade; 3) o cininogênio de alto peso molecular participa da ativação por contato do sistema intrínseco da coagulação sangüínea, como cofator não enzimático e; 4) o T-cininogênio é a principal proteína da fase aguda da inflamação no rato (MÜLLER-ESTERL et al., 1988).

A diversidade de funções dos cininogênios está associada à sua estrutura protéica complexa. Os vários tipos de cininogênios são proteínas de cadeias simples e apresentam três domínios: uma cadeia pesada amino terminal de 50.000-60.000, um segmento cinina na porção central da molécula e

uma cadeia leve C-terminal. As cadeias leve e pesada são interligadas através de uma ponte dissulfeto.

Bradicinina, lisil-bradicinina (calidina), metionil-lisil-bradicinina e T-cinina são polipeptídeos denominados genericamente como cininas. A calidina, um decapeptídeo, foi descoberta por WERLE et al. (1937). ROCHA e SILVA et al. (1949) descreveram a liberação de um peptídeo ativo, pela incubação do veneno de Bothrops jararaca ou da tripsina com a fração pseudo-globulina do plasma. A esse peptídeo eles deram o nome de bradicinina. Uma terceira cinina, a metionil-lisil-bradicinina foi descoberta por ELLIOT & LEWIS (1965) na fração pseudo-globulina do soro bovino. Finalmente, a T-cinina (Ile-Ser-bradicinina) encontrada no plasma de rato, foi descoberta por OKAMOTO & GREENBAUN (1983).

SCHACHTER & THAIN (1954) introduziram o termo cinina, porque lhes pareceu, por comparação direta, que calidina e bradicinina pertenciam a um grupo de peptídeos intimamente relacionados. Tais substâncias, ocorriam naturalmente em venenos de vespas e outros venenos ou eram liberadas de um substrato no plasma por calicreínas, tripsina, venenos de serpentes e, possivelmente, por outras proteases (SCHACHTER, 1980).

O nome cininogenase usado simultaneamente e independentemente por PRADO (1962), BHOOLA et al. (1962) e por SCHACHTER (1963) foi recomendado pelo "Committee on Nomenclature for Hypotensive Peptides" (WEBSTER, 1966) como

termo genérico que abrange as enzimas que liberam cininas de um substrato protéico inativo. Da mesma maneira, o termo cininogênio indica o substrato das calicreínas. Assim, o termo cininogenase inclui calicreínas, tripsina, venenos de serpentes e outras enzimas que produzam cinina por proteólise limitada do cininogênio.

As calicreínas, como outras glicoproteínas secretadas, são sintetizadas como uma proenzima no retículo endoplasmático rugoso e glicosiladas no complexo de Golgi. In vitro a pro-calicreína pode ser ativada por enzimas como a tripsina. Entretanto, ainda não se conhece a ativação enzimática intracelular da proenzima (MACDONALD et al., 1988).

A localização celular das calicreínas, segundo BERG (1988), parece ser a mesma em todas as espécies de mamíferos. Nas glândulas salivares a enzima é encontrada no sistema de ductos. A técnica de histoquímica com hibridização in situ, mostrou que o RNA mensageiro da calicreína tissular renal está localizado no glomérulo, bem como nos túbulos distais (XIONG et al., 1989). A calicreína urinária, segundo TAKAOKA et al. (1982) é de origem renal e se encontra presente tanto na forma ativa como na forma de uma proenzima.

No pâncreas, a calicreína é observada nas células acinares, distribuída em todos os grânulos secretores como uma proenzima, que se torna ativada no trajeto das células acinares para o duodeno (WOODLEY et al., 1985).

A caracterização enzimática das calicreínas tissulares, isoladas de vários órgãos, pode ser feita pela medida de sua atividade enzimática, mensurável por ensaio biológico ou por ensaios com substratos sintéticos. O ensaio biológico utiliza a preparação isolada de musculatura lisa, habitualmente o útero isolado de rata ou o íleo isolado de cobaia. A atividade enzimática é estimada pela contração causada pela cinina, liberada do cininogênio presente no plasma. Nos ensaios com substratos sintéticos utilizam-se derivados da arginina  $N\alpha$ -substituída, ésteres (métodos colorimétricos e titulométricos), p-nitroanilidas (métodos colorimétricos), metilcumarinas e tetrapeptídeos fluorogênicos apagados intramolecularmente (métodos fluorimétricos).

As calicreínas tissulares são susceptíveis em graus variáveis a alguns inibidores de proteases de origem animal ou vegetal e a inibidores sintéticos. Dentre os inibidores naturais destaca-se a aprotinina, um inibidor de serino-proteases isolado de tecidos bovinos, como pulmão e pâncreas. A aprotinina foi descoberta por FREY et al. (1930), como inativador de calicreínas, e descrita independentemente por KUNITZ & NORTHROP (1936) citados por FRITZ et al. (1979), como inibidor de tripsina. O inibidor apresenta ponto isoelétrico em pH 10 e possui um resíduo lisil na posição 15 da molécula, o qual participa na ligação enzima-inibidor (BECKMANN et al., 1988). Além da tripsina e quimotripsina ela inibe fortemente a plasmina, a proteína C e todas as

calicreínas (FRITZ & WUNDEIER, 1983; TABY et al., 1990) citados por PINTIGNY & DACHARY-PRINGENT (1992). Esta especificidade explica seu uso terapêutico inicial, particularmente na pancreatite, em vários estados de choque ou na hemorragia hiperfibrinolítica.

A aprotinina, segundo GEIGER et al. (1977), é um inibidor competitivo da calicreína urinária humana. Entretanto, MIRANDA et al. (1995) demonstraram que a inibição da calicreína urinária humana pela aprotinina é do tipo competitiva parabólica, com duas moléculas do inibidor ligando-se a uma molécula de calicreína.

Vários inibidores sintéticos específicos já foram analisados quanto a sua habilidade para inibir as calicreínas tissulares. Assim, o diisopropilfluorofosfato (DFP), que reage com o resíduo de serina cataliticamente ativo, inibe irreversivelmente várias calicreínas tissulares, como foi demonstrado para as calicreínas urinária de cavalo (PRADO et al., 1962) e urinária humana (GEIGER & FRITZ, 1981).

Todas as calicreínas testadas não foram inativadas pela clorometilcetona da  $N\alpha$ -p-tosil-L-lisina (TLCK), inibidor de tripsina que reage com o resíduo de histidina do centro ativo, como descrito por MARES-GUIA & DINIZ (1967). A presença de um resíduo de Tyr-99 relativamente móvel, cuja cadeia lateral se estende na direção do sítio de ligação de um resíduo de Ser-226 obstrui parcialmente este sítio. Pela mudança conformacional não usual da alça formada pelos

resíduos 517 a 519 resultam em mudanças conformacionais no sítio de ligação da calicreína de pâncreas de porco, em relação à tripsina (BODE et al., 1983).

Outro importante grupo de inibidores sintéticos de serino-proteases são os compostos derivados de amidinas e guanidinas. Benzamidina, um derivado destes compostos, é um forte inibidor de tripsina (MARES-GUIA & SHAW, 1965) e, segundo HIAL et al. (1974) e GEIGER et al. (1977) inibe competitivamente a calicreína urinária humana.

A hidrólise de duas ligações peptídicas diferentes na molécula de cininogênio, pelas calicreínas tissulares, liberando lisil-bradicinina, tem intrigado os pesquisadores que estudam o sistema calicreína-cinina. Análises da proteólise limitada do cininogênio de baixo peso molecular pela calicreína pancreática de porco demonstraram que o aparecimento da bradicinina e das cadeias leve e pesada é simultâneo, sugerindo que esses dois fragmentos, juntamente com a bradicinina, são os produtos primários da hidrólise (MÜLER-ESTERL et al., 1985).

O sítio ativo das calicreínas tem alta homologia com o sítio ativo da tripsina e da quimotripsina, conservando a tríade catalítica His-41, Asp-96 e Ser-189 das serino-proteases, como pode ser observado no trabalho descrito por KELLERMANN et al. (1987).

BODE et al. (1983) propõem que o determinante principal da clivagem específica do cininogênio pela calicreína pancreática de porco é a existência de uma

bolsa hidrofóbica formada pelos resíduos de aminoácidos Tyr-93 e Trp-205, que facilitaria a ligação de resíduos hidrofóbicos localizados na posição  $P_2$  do substrato (nomenclatura de SCHECHTER & BERGER, 1967), adjacente ao sítio de clivagem.

Os estudos de PRADO et al. (1986), utilizando tetrapeptídeos sintéticos como substratos, evidenciaram a presença de resíduos hidrofóbicos na posição  $P_2$  do substrato como uma característica estrutural exigida por várias calicreínas tissulares. Efeitos das interações de subsítios sobre a eficiência catalítica da calicreína urinária de cavalo, analisados por ARAÚJO-VIEL et al. (1988), utilizando substratos sintéticos do tipo peptidil-4-nitroanilida, demonstraram a preferência desta calicreína por fenilalanina na posição  $P_2$  do substrato.

As calicreínas tissulares, conforme já mencionado, liberam o decapeptídeo calidina ou lisil-bradiginina (KRAUT et al., 1930) do cininogênios, pela hidrólise em dois sítios com diferentes seqüências: a saber, na ligação Met-Lys e na ligação Arg-Ser do segmento do cininogênio bovino (HAN et al., 1976) Ser-Leu-Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ser-Val-Gln (HABERMANN, 1966; YANO et al., 1971). Enquanto a última hidrólise, no sítio C-terminal é consistente com a especificidade da tripsina (ROCHA E SILVA et al., 1949) e com a especificidade semelhante à da tripsina das calicreínas, a hidrólise no sítio N-terminal, com um resíduo de metionina na posição  $P_1$  (nomenclatura de SCHECHTER

& BERGER, 1967), é surpreendente e é diferente da especificidade da tripsina e da calicreína plasmática que hidrolisam a ligação Lys-Arg adjacente à ligação Met-Lys.

Segundo PRADO et al. (1992) tem sido demonstrado que as calicreínas glandulares também liberam calidina de peptídios sintéticos tais como Leu-Met-Lys-bradiginina (IWANAGA et al., 1977) e Gly-Leu-Met-Lys-bradiginina (ARAÚJO-VIEL et al., 1981), mostrando que a enzima pode hidrolisar a ligação Met-Lys nessas moléculas. Estas observações indicam que a especificidade da hidrólise no sítio N-terminal é determinada não somente pela conformação do sítio de clivagem da bradiginina nos cininogênios, mas também, pela própria sequência específica de aminoácidos. Segundo PRADO et al. (1992), esse tipo especial de especificidade das calicreínas tissulares tem sido atribuído a interações secundárias em seus sítios de ligação estendidos.

Até agora, várias calicreínas tissulares já foram isoladas, purificadas e caracterizadas como as calicreínas pancreática, submandibular e urinária de porco, salivar e urinária de humanos, pancreática, submandibular e urinária de ratos, submandibular de camundongo e gato, pancreática de cão e urinária de cavalo (FIEDLER, 1979); a calicreína estomacal de rato (UCHIDA et al., 1980), a calicreína urinária de cão (MURTHY et al., 1986) e a calicreína de glândula submandibular de rato (MATSUDA et al., 1986). Com relação à calicreína urinária humana, há vários trabalhos na literatura, descrevendo o seu isolamento,

purificação e caracterização (MORIYA et al., 1963; HIAL et al., 1974; MATSUDA et al., 1976; GEIGER et al., 1977; OZA & RYAN, 1978; OLE-MOIYOI et al., 1977 e 1979; LEVINSKY et al., 1979; GEIGER et al., 1980; MORICHI et al., 1984). As calicreínas, como outras enzimas, também ocorrem em múltiplas formas, segundo demonstram NUSTAD & PIERCE (1974), para a calicreína urinária de rato; FRITZ et al. (1977), para as calicreínas pancreática, submandibular e urinária de porco; MORIYA et al. (1977), para a calicreína renal de cão; MORIYA et al. (1963 e 1973), HIAL et al. (1974), MATSUDA et al. (1976), OLE-MOIYOI et al. (1977 e 1979), GEIGER et al. (1977 e 1980), MORICHI et al. (1984), LIMA (1986), MIRANDA (1990), para a calicreína urinária humana.

Quanto à composição química, as calicreínas pancreáticas de porco e urinária humana têm sido as mais estudadas, já se conhecendo as suas seqüências completas (TSCHESCHE et al., 1979; KELLERMANN et al., 1987).

Apesar de alguns trabalhos já terem sido publicados a respeito do isolamento, purificação e caracterização de calicreínas tissulares humanas (pancreática, salivar e urinária) e de animais como rato, cão, cavalo, coelho, etc, há relativamente poucos trabalhos publicados referentes às suas propriedades cinéticas. HIAL et al. (1974), OLE-MOIYOI et al. (1977), e GEIGER & FRITZ (1981) reportaram valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  para as hidrólises de alguns substratos sintéticos, dos tipos amida e éster, derivados da arginina, pela calicreína urinária humana. FUJIMOTO et al. (1973) publicaram

os valores de  $K_m$  para as hidrólises dos substratos Tos-Arg-OMe e Bz-Arg-OEt pela calicreína salivar humana. De acordo com esses autores as velocidades de hidrólise dos substratos utilizados obedecem à cinética de Michaelis-Menten. Porém, OLE-MOIYOI et al. (1977) observaram desvios deste comportamento cinético e mostraram que a calicreína urinária humana sofre inibição pelo substrato em concentrações elevadas de Tos-Arg-OMe e Bz-Arg-OMe.

Trabalho cinético realizado em nosso laboratório com a calicreína submandibular de rato e substratos sintéticos dos tipos amida e éster derivados da arginina  $N\alpha$ -substituída mostrou que a enzima apresenta comportamento cinético bimodal, obedecendo à cinética de Michaelis-Menten em baixas concentrações dos substratos e sendo inibida em concentrações mais altas dos substratos (SOUSA, 1993).

Os estudos com as calicreínas urinária e submandibular de rato têm levado à proposição de que há uma diversidade funcional e/ou estrutural entre estas calicreínas tissulares. Esta proposição é baseada na diferente localização celular (BERG, 1988), na forma enzimática predominante no órgão (TAKADA et al., 1985), no controle eletrolítico e hormonal da síntese e secreção (MILLER et al., 1984) e no comportamento cinético distinto destas calicreínas (SILVA et al., 1974 e SOUSA, 1993).

LIMA (1986) em seu trabalho de mestrado, realizado em nosso laboratório, isolou e purificou três formas de calicreína urinária humana. Porém, as quantidades obtidas

destas formas enzimáticas foram insuficientes para que se pudesse realizar um estudo mais abrangente das suas propriedades cinéticas. Para o estudo da caracterização cinética destas calicreínas foram utilizados apenas os substratos sintéticos acetil-fenilalanil-arginina p-nitroanilida (Ac-Phe-Arg-Nan) e H-D-valil-leucil-arginina p-nitroanilida (H-D-Val-Leu-Arg-Nan) e, de acordo com esse trabalho, as três formas da calicreína urinária humana obedeceram à cinética de Michaelis-Menten nas faixas de concentrações dos substratos utilizadas.

Apesar de alguns estudos cinéticos já terem sido realizados com as calicreínas tissulares humanas, há muito que se aprender sobre as suas especificidades, os seus mecanismos de ação enzimática e os fatores que afetam suas especificidades tanto "in vitro" quanto "in vivo".

## OBJETIVO GERAL

Purificar e realizar estudos cinéticos com a calicreína urinária humana, utilizando substratos sintéticos  $N\alpha$ -derivados da arginina dos tipos amida e éster na ausência e na presença de inibidores naturais e sintéticos visando obter um melhor conhecimento sobre as propriedades catalíticas da enzima e o seu mecanismo de ação enzimática.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Desenvolver um método simplificado e eficiente para a purificação da calicreína urinária humana.
- 2 - Realizar estudos da cinética de hidrólise de substratos sintéticos dos tipos amida e éster, derivados da arginina N $\alpha$ -substituída, pela calicreína urinária humana, explorando amplas faixas de concentração dos substratos, para verificar se a enzima obedece à cinética de Michaelis-Menten, ou se ela sofre ativação ou inibição pelo substrato.
- 3 - Determinar os parâmetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$ , e  $k_{cat}$  da calicreína urinária humana com substratos sintéticos N $\alpha$ -derivados da arginina dos tipos amida e éster.
- 4 - Estudar o mecanismo de inibição da calicreína urinária humana pela aprotinina.
- 5 - Estudar o mecanismo de inibição da calicreína urinária humana pela benzamidina e derivados.

## II - METODOLOGIA

### II.1. Concentração da urina humana

#### II.1.1. Coleta da urina humana

A coleta da urina humana masculina era feita em frasco de vidro de 10 litros, siliconizado, contendo um funil de vidro com gaze para a filtração da mesma. Adicionavam-se ao frasco 10 ml de uma solução de azida de sódio a 0,2% (p/v) (Sigma), com o objetivo de se evitar a proliferação bacteriana. Durante a coleta da urina, o frasco era mantido em banho de gelo. Coletavam-se de 5 a 10 litros de urina de cada vez.

#### II.1.2. Precipitação isoelétrica da glicoproteína de Tamm Horsfall

Após a coleta o pH da urina era ajustado para 8,0 (pH-Meter E 512-Metronm Herisau) através da adição de solução de hidróxido de sódio (Vetec), 6,0 N. Em seguida, a urina era guardada em câmara fria, a 4°C, durante doze horas, para que a glicoproteína de Tamm Horsfall fosse precipitada (GIUSTTI et al., 1988). O precipitado formado era então separado da urina por filtração a vácuo na qual se utilizava um Kitasato de 4 litros, um funil de Büchner e filtro de papel qualitativo (Frama).

A urina, livre da glicoproteína de Tamm Horsfall, era submetida às sucessivas etapas de concentração.

### II.1.3. Concentração da calicreína urinária humana com o gel poli (N-isopropilacrilamida)

A urina humana era concentrada cerca de 20 vezes, em quatro ciclos (expansão-regeneração) de acordo com o seguinte esquema : o gel poli(N-isopropilacrilamida) 10 X 1 (10% (p/v) de N-isopropilacrilamida sendo que 1% dos monômeros consiste no agente de ligação cruzada N,N'-metilenobisacrilamida), seco ou contraído, em quantidades apropriadas, era misturado com a urina durante 2 horas, a 4°C. O gel se expandia e absorvia grande parte da água e de outras moléculas de baixo peso molecular. A urina, já mais concentrada, era separada do gel expandido por filtração em funil de Büchner e era então guardada sob refrigeração para que pudesse retornar ao processo. O gel expandido era submetido a um processo de recuperação que consistia em deixar o gel durante uma hora e trinta minutos à temperatura de 50°C provocando a sua súbita contração com a conseqüente liberação das moléculas absorvidas (extrato). O gel contraído era separado por filtração e reutilizado para dar continuidade às concentrações. A Figura 2 ilustra o processo de concentração via gel termosensível (FREITAS & CUSSLER, 1987).

O processo era repetido até que o volume de urina fosse reduzido de aproximadamente vinte vezes.

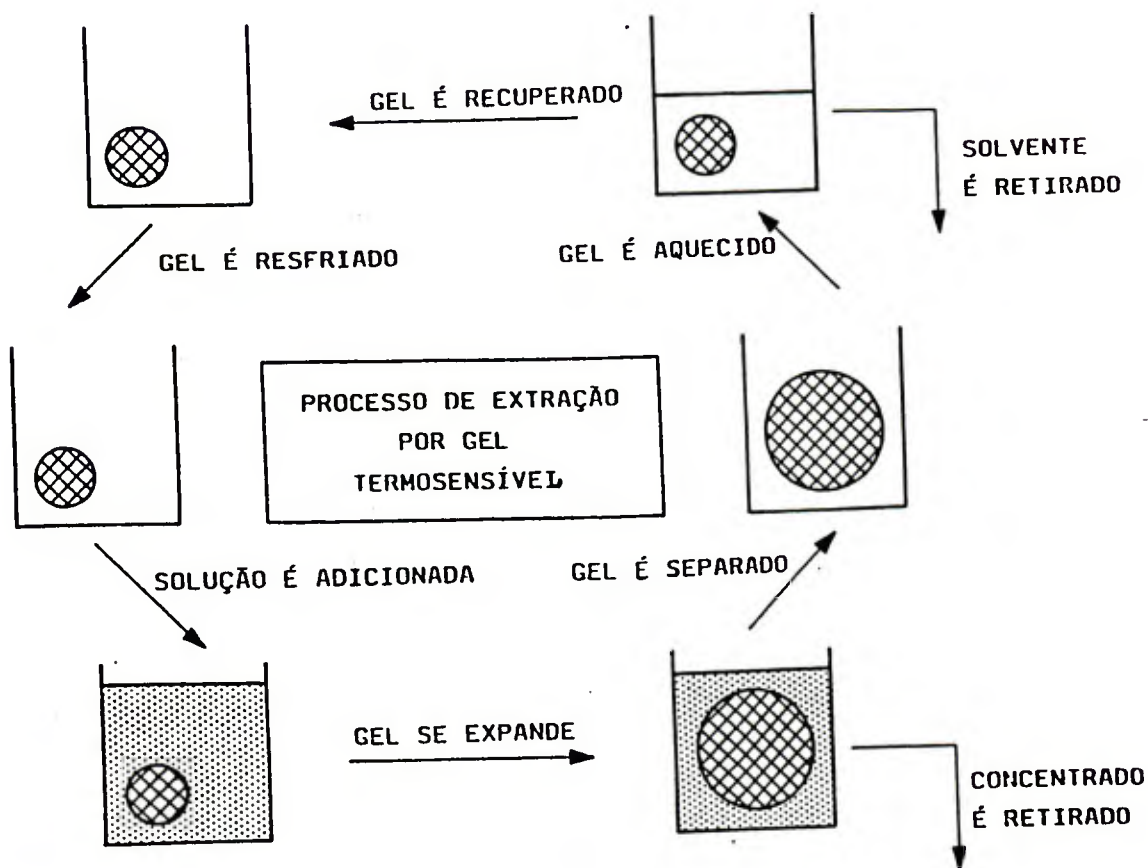


FIGURA 2 - Representação do processo de concentração de macromoléculas através da utilização de géis termossensíveis.

#### II.1.4. Diálise e liofilização

Após a concentração, a urina era dialisada e liofilizada. A diálise era feita em câmara fria, a 4°C, durante cinco dias, contra água destilada, que era trocada duas vezes ao dia. Terminada a diálise, a urina era distribuída em bandejas de aço inox, congelada e liofilizada (liofilizador Virtis Modelo 10.146 MR-BA). O pó urinário humano obtido era armazenado congelado.

### II.2. Purificação da calicreína urinária humana

#### II.2.1. Preparação do extrato bruto

Na preparação do extrato bruto eram dissolvidos 5,0 gramas de pó urinário humano, provenientes de 30 litros de urina, em 100 ml de tampão glicina-NaOH 0,1 M, contendo NaCl 0,75 M, pH 9,0, e azida sódica 0,05%. A solução era deixada sob agitação branda, com barra magnética, durante 6 horas a 4°C e, a seguir, centrifugada a 9.000 r.p.m. (Centrífuga Himac CR 20B2) durante trinta minutos, a 4°C. O sobrenadante (extrato bruto) era submetido à dosagem de proteínas pelo método de BRADFORD (1976), e a determinação da atividade enzimática, com o substrato Ac-Phe-Arg-Nan (fornecido pelo Prof. Dr. Luiz Juliano do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, São Paulo).

## II.2.2. Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina

Vinte gramas de Sepharose ativada pelo brometo de cianogênio (Sigma) foram acoplados com 500 mg de aprotinina (Sigma), segundo a técnica descrita por GEIGER & FRITZ (1981). O gel resultante, 50 ml, foi empacotado em coluna (9,2 cm X 2,5 cm) equilibrada em tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, contendo NaCl 0,75 M e 0,05% de azida de sódio.

Após a aplicação de 100 ml de extrato bruto (530 mg de proteína) a coluna era lavada exaustivamente com o tampão de equilíbrio (frações de 10 ml), e, em seguida, a calicreína era eluída com tampão acetato de sódio 0,025 M pH 3,5, contendo NaCl 1,0 M, 0,05% de azida de sódio. As frações eluídas (2,0 ml) eram coletadas em tubos de ensaio contendo 0,5 ml de Tris-HCl 2,0 M, pH 8,5 para elevar o pH a um valor próximo de 7,0. As frações eram analisadas quanto à absorção em 280 nm e à atividade amidásica com Ac-Phe-Arg-Nan. A seguir, a coluna era regenerada com 200 ml de solução de uréia 6 M (Grupo Química) seguida do tampão de equilíbrio.

As frações que continham calicreína eram agrupadas e a mistura resultante era dialisada contra água destilada e concentrada para 10,0 ml em equipamento de ultrafiltração (Amicon). A amostra concentrada era analisada quanto ao teor de proteínas, a atividade amidásica, ao perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma) e 2-mercaptoetanol

(Sigma), a cromatografias de fase reversa e de troca iônica em equipamento HPLC e a cromatografia de filtração molecular em equipamento FPLC.

### II.3. Métodos analíticos

#### II.3.1. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas eram realizadas pelo método de BRADFORD (1976), usando soroalbumina bovina (Sigma) como padrão.

Para a preparação do reagente dissolviam-se 100 mg de Comassie Brilhante Blue G-250 (Sigma) em 50 ml de etanol a 95% (Reagen). Em seguida, adicionavam-se 100 ml de ácido fosfórico a 85% (Berzog) e completava-se o volume para um litro com água destilada. A solução final era filtrada em filtro de papel qualitativo e armazenada a 4°C.

Nas dosagens, em triplicatas, adicionavam-se 100 µl da amostra e 5,0 ml da solução reagente. As misturas eram agitadas e as absorvâncias das reações eram lidas em 595 nm.

Como padrão, usava-se soroalbumina bovina em duas concentrações, 0,1 e 0,5 mg/ml, cujas leituras das absorvâncias eram tomadas como base de cálculo das concentrações das amostras através da equação:

$$P = b \cdot A / (1 - a \cdot A)$$

onde

$$a = A_m^{-1} - b \cdot P_m^{-1}$$

$$b = (A_e^{-1} - A_h^{-1}) / (P_e^{-1} - P_h^{-1})$$

$$A_m^{-1} = (A_e^{-1} + A_h^{-1}) / 2$$

$$P_m^{-1} = (P_e^{-1} + P_h^{-1}) / 2$$

P = concentração das proteínas (mg/ml)

A = absorvância em 595 nm

A<sub>e</sub> = absorvância do padrão de menor concentração

A<sub>h</sub> = absorvância do padrão de maior concentração

P<sub>e</sub> = padrão de menor concentração (mg/ml)

P<sub>h</sub> = padrão de maior concentração (mg/ml)

### II.3.2. Medida da atividade amidásica

A atividade amidásica com o substrato Ac-Phe-Arg-Nan era realizada segundo os métodos de ERLANGER et al., (1961) e de MARES-GUIA (1968).

Para tanto, preparava-se a solução de substrato Ac-Phe-Arg-Nan (PM = 537), dissolvendo-se 0,32 mg em 0,05 ml de sulfóxido de dimetila (Aldrich) e 0,95 ml de tampão glicina (Sigma)-NaOH (Sigma) 0,2 M pH 9,0. A concentração desta solução era de  $5,96 \times 10^{-4}$  M.

A amostra, 50  $\mu$ l, era incubada com 450  $\mu$ l de solução de Ac-Phe-Arg-Nan, a 37°C, durante 20 min, e a reação era paralisada por resfriamento mergulhando-se os tubos em banho de gelo (extrato bruto) ou pela adição de 50  $\mu$ l de solução de ácido acético a 60% (v/v). Sob as mesmas

condições eram incubados um controle do substrato, que consistia de 450  $\mu\text{l}$  da solução de substrato e 50  $\mu\text{l}$  de tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0 e um controle da amostra, que consistia de 450  $\mu\text{l}$  de tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0 e 50  $\mu\text{l}$  da amostra. Todas as incubações eram feitas em triplicatas.

As absorvâncias das reações eram lidas em 410 nm e transformadas em velocidades em mM de p-nitroanilina (pNan) / (mg.min) através da equação

$$v = \Delta A_{410} \times (1/\epsilon) \cdot (1/t) \cdot (10^3/f) \cdot 1,1$$

onde

$\Delta A_{410}$  = absorvância da incubação com a amostra menos absorvância dos controles do substrato e da amostra.

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) da p-Nan em 410 nm ( $\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

t = tempo de incubação (min).

$10^3$  = fator de conversão de M para mM.

f = quantidade de proteína na incubação (mg).

1,1 = fator de correção do volume da reação para o volume final, em que era realizada a leitura da absorvância.

A concentração molar real do substrato era calculada após hidrólise total pela tripsina, através da equação

$$C_{m \text{ real}} = \Delta A_{410} / (\epsilon \cdot d)$$

onde

$\Delta A_{410}$  = absorvância da mistura após a hidrólise total menos absorvância do controle do substrato em 410 nm.

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar da p-nitroanilina em 410 nm ( $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

d = caminho óptico = 1 cm.

A hidrólise total era realizada incubando-se 450  $\mu\text{l}$  da solução do substrato  $10^{-4}$  M com 50  $\mu\text{l}$  da solução de  $\beta$ -tripsina (fornecida pelo Prof. Dr. Edyr Rogana, Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB da UFMG) em HCl pH 3,0, durante seis horas à 37°C. Em seguida adicionavam-se 50  $\mu\text{l}$  de ácido acético 60% (v/v). O controle do substrato continha 450  $\mu\text{l}$  da solução de substrato ( $10^{-4}$  M), 50  $\mu\text{l}$  de uma solução de HCl pH 3,0 em substituição à enzima e 50  $\mu\text{l}$  de ácido acético a 60% (v/v). Liam-se as absorvâncias das reações em 410 nm. As velocidades das reações eram calculadas como já descrito.

### II.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As eletroforeses eram realizadas em placas segundo o método de WEBER & OSBORN (1975) modificado.

Os géis, com 12% de acrilamida, eram polimerizados a partir de misturas adequadas das seguintes soluções:

**1. Solução de acrilamida ( 30 : 0,8 )**

acrilamida (Sigma) .....30,00g  
 metileno bis-acrilamida (Sigma).....0,80g  
 água destilada q.s.p.....100ml

**2. Solução de persulfato de amônio (Sigma) a 10% (p/v)**

**3. Solução de SDS (Sigma) a 10% (p/v)**

**4. Solução de TEMED (Sigma) a 1% (v/v)**

Os géis de concentração continham 5% (p/v) de acrilamida e eram polimerizados a partir de misturas adequadas das quatro soluções mencionadas anteriormente.

O tampão para dissolver as amostras era constituído de:

Tris-HCl 2 M pH 6,8.....0,20 ml  
 Solução de azul de bromofenol (Sigma) a 0,05%.....0,12 ml  
 Solução de glicerol (Sigma) a 60%.....1,00 ml  
 2-mercaptoetanol (Sigma).....0,30 ml  
 Solução de SDS a 10% (p/v).....0,60 ml

As amostras eram aplicadas em volumes variados, inferiores a 100  $\mu$ l, conforme a concentração de proteína na amostra.

O tampão dos eletrodos era constituído de Tris 0,05 M/glicina (Sigma) 0,384 M pH 8,3, contendo 0,1% (p/v) de SDS.

As eletroforeses eram conduzidas sob uma diferença de potencial de 150 volts.

Para a detecção das bandas usava-se a coloração pela prata, segundo o método de TUNÓN & JOHANSSON (1984), modificado.

### **Soluções utilizadas**

#### **1. Pré-fixador 1**

metanol (Vetec) .....	500 ml
água destilada .....	430 ml
ácido acético glacial (Vetec) .....	70 ml

#### **2. Pré-fixador 2**

metanol .....	100 ml
água destilada .....	800 ml
ácido acético glacial .....	100 ml

#### **3. Fixador de glutaraldeído**

solução de glutaraldeído (Merck) a 25% .....	100 ml
água destilada .....	200 ml

**4. Solução de prata amoniaca**

nitrato de prata (Sigma) .....1,0 g  
 água destilada .....320 ml  
 hidróxido de sódio (Merck) .....0,1 g  
 hidróxido de amônio (Synth) q.s.p. para dissolver precipitados

**5. Revelador**

água .....400 ml  
 solução de formaldeído (Merck) a 37% .....400  $\mu$ l  
 solução de ácido cítrico (Merck) 2,3 M .....100  $\mu$ l

**6. Inativador**

água.....400 ml  
 ácido acético glacial.....4,0 ml  
 etanolamina (Synth).....200  $\mu$ l

Terminada a eletroforese, o gel era lavado com água e deixado no pré-fixador 1 durante 2 horas. Em seguida, retirava-se o primeiro e adicionava-se o segundo pré-fixador, no qual o gel era deixado aproximadamente 12 horas. Em seguida, o pré fixador 2 era removido e o gel era lavado com água e deixado no fixador de glutaraldeído durante 45 min.

O gel era novamente lavado com água e, a seguir, adicionava-se a solução de prata amoniaca, na qual ele permanecia durante uma hora, no escuro e sob agitação.

Lavava-se novamente o gel com água e, então, adicionava-se a solução reveladora, que era retirada logo após a obtenção de uma coloração satisfatória. Adicionava-se, a seguir, a solução inativadora, na qual o gel permanecia durante duas horas. Finalmente, o gel era submetido a um processo de pré-encolhimento deixando-o em contato com o pré-fixador 1, durante quatro horas, e, a seguir, plastificado.

Para a plastificação, o gel era fixado entre duas folhas de celofane, contendo uma solução de gelatina comercial a 4,8% (p/v) e deixado secar ao ar livre. A solução de gelatina impedia que a secagem fosse muito rápida, evitando assim, uma possível quebra do gel.

#### **II.3.4. Cromatografia de fase reversa em HPLC**

A cromatografia de fase reversa era realizada em um equipamento HPLC (Shimadzu), aplicando-se 100  $\mu$ l da solução de calicreína urinária humana (44  $\mu$ g/ml) a uma coluna Poros (crosslinked Polystyrene/divinylbenzene) (4,6 x 100 mm), equilibrada em ácido trifluoracético (Merck) 0,1% (v/v) e acetonitrila (Baker) 3,0% (v/v), conectada a um sistema de duas bombas (LC-10AD). Após a aplicação da amostra a coluna era reequilibrada até que a linha de base retornasse ao ponto zero. A seguir, era aplicado à coluna um gradiente linear até 70% de acetonitrila, contendo 0,1% de ácido trifluoracético, durante 15 min. O fluxo era de 3,0 ml/min.

Os picos eram detectados através de um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu SPD-10AV) em 245 nm.

### **II.3.5. Cromatografia de troca iônica em HPLC**

A cromatografia de troca iônica era realizada em um equipamento HPLC (Shimadzu) aplicando-se 100 µl da solução de calicreína urinária humana (44 µg/ml) a uma coluna Poros II Q/P (4,6 x 50 mm) equilibrada em tampão borato de sódio 0,05 M, pH 9,0, conectada a um sistema de duas bombas (LC-10AD). Após a aplicação da amostra a coluna era reequilibrada até que a linha de base retornasse ao ponto zero. A eluição era feita utilizando-se um gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0 M. A detecção dos picos era feita através de um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu SPD-10AV) em 280 nm.

## **II.4. Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana**

### **II.4.1. Determinação do peso molecular aparente por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-mercaptoetanol**

As eletroforeses eram realizadas conforme descrito no item II.3.3. Usavam-se como padrões de peso molecular soroalbumina bovina (PM 66.000), ovoalbumina (PM 45.000),

anidrase carbônica (PM 29.000) e SBTI (PM 20.100), todos da Sigma.

Construía-se uma curva padrão locando-se na abcissa os valores de  $R_f$  dos padrões e na ordenada os valores dos logaritmos dos respectivos pesos moleculares. O peso molecular da calicreína era estimado por interpolação gráfica.

#### **II.4.2. Determinação do peso molecular aparente por cromatografia de exclusão molecular**

O peso molecular aparente da calicreína urinária humana foi estimado, também por cromatografia em coluna de Superose 12 HR 10/30 (10,0 mm X 30,0 mm) em equipamento FPLC (Pharmacia). A coluna era equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM, contendo NaCl 0,1 M, pH 6,5, com fluxo de 0,25 ml/min. Como padrões de peso molecular empregavam-se a soroalbumina bovina (PM 66.000), ovoalbumina (PM 45.000), anidrase carbônica (PM 29.000) e ribonuclease A (Sigma) (PM 13.700), na concentração de 1,0 mg/ml, dissolvidos no tampão de equilíbrio. O volume das frações era de 0,25 ml e o volume de exclusão ( $V_o$ ) da coluna era determinado por cromatografia de dextrana azul (Sigma) na mesma coluna. Conhecendo-se o volume de eluição ( $V_e$ ) de cada proteína padrão e o volume total da coluna ( $V_t$ ), calculava-se o valor de  $k_{av}$  (LAURENT & KILLANDER, 1964), para cada padrão, usando-se a equação:

$$k_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Construía-se uma curva padrão locando-se na ordenada o logaritmo dos pesos moleculares dos padrões e, na abcissa, seus respectivos valores de  $k_{av}$ . O peso molecular aparente da calicreína urinária humana era determinado por interpolação gráfica.

#### **II.4.3. Determinação do peso molecular por titulação com aprotinina**

O peso molecular da calicreína urinária humana foi calculado, também, a partir do conhecimento da concentração molar da enzima em solução e da concentração de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) na mesma solução. A concentração molar da enzima foi determinada conforme descrito no item II.5.1 e a concentração de proteínas pelo método de BRADFORD (1976), descrito no item II.3.1.

### **II.5. Caracterização cinética da calicreína urinária humana**

#### **II.5.1. Titulação do centro ativo da calicreína urinária humana**

A concentração molar de calicreína urinária humana ativa era determinada pela titulação da enzima com solução de aprotinina (Sigma), a qual tinha sua concentração molar

determinada por titulação com solução de  $\beta$ -tripsina previamente titulada pelo p-guanidino-benzoato de p'-nitrofenila (NPGB) (Sigma) segundo o método descrito por CHASE & SHAW (1967). A mistura de incubação consistia de 50  $\mu$ l da solução de calicreína (2,0  $\mu$ g/ml) e 50  $\mu$ l da solução de aprotinina em tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0 em concentração variando de 10-150 nM. O controle continha 50  $\mu$ l do tampão em substituição à solução de aprotinina. As misturas, em triplicatas, eram incubadas a 37°C durante 15 min. Adicionavam-se então 400  $\mu$ l da solução do substrato (12,5-25,0  $\mu$ M) D-Val-Leu-Arg-Nan (Chromogenix AB, Suécia) (PM 579,6) em glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0 e incubava-se novamente a 37°C durante 5-10 min. A reação era interrompida pela adição de 50  $\mu$ l de solução de ácido acético a 60% (v/v) e as absovâncias das misturas eram lidas em 410 nm e transformadas em velocidades residuais ( $\mu$ M de p-nitroalínina liberada por minuto) de acordo com a equação:

$$v = (\Delta A / 8800) \cdot (1/t) \cdot 10^6 \cdot 1,1$$

onde

$\Delta A$  = variação da absorvância da p-nitroanilina a 410 nm.

8800 = coef. de extinção molar da p-nitroanilina a 410 nm ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ).

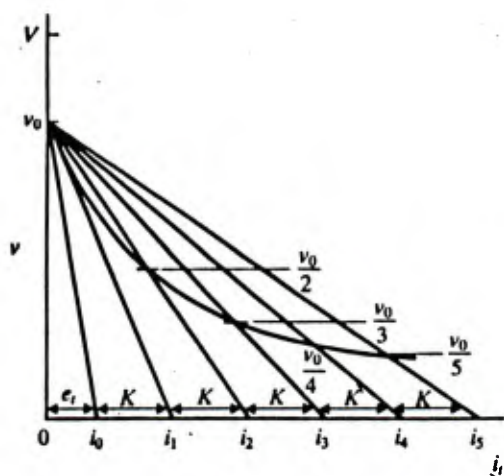
t = tempo de incubação em minutos.

1,1 = fator de correção do volume da reação para o volume final em que era realizada a leitura da absorvância.

$10^6$  = fator de conversão de M para  $\mu\text{M}$ .

Para cada concentração do substrato era construído um gráfico de velocidade versus concentração de aprotinina onde eram obtidas hipérbolas.

De acordo com DIXON (1972) quando o inibidor é competitivo e de alta afinidade a concentração da enzima pode ser obtida diretamente do gráfico de  $v$  versus  $[I]$ . Traçando-se retas de  $v_0$  (velocidade da reação sem inibidor a uma dada concentração do substrato) até os pontos  $v_0/4$ ,  $v_0/3$  e  $v_0/2$  obtem-se os valores de  $K_i$  aparente que são dados pela distância entre os pontos de interseção na abcissa de duas retas adjacentes. Para extrair o valor da concentração da enzima ativa traça-se uma reta a partir de  $v_0$  até o ponto da abcissa correspondente a  $2 \times K_i$  à esquerda do intercepto ao eixo X da reta traçada de  $v_0$  a  $v_0/2$ . Assim, como pode ser observado na Figura 3, a distância da origem ao intercepto desta reta corresponde ao valor da enzima ativa.



**FIGURA 3** - Representação esquemática do método gráfico proposto por DIXON (1972) para a determinação da concentração da enzima ativa ( $e_0$ ) e da constante de dissociação do complexo enzima-inibidor ( $K_i$ ).

## II.5.2. Cinética de hidrólise dos substratos sintéticos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan

### II.5.2.1. Efeito do pH sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana.

Nestes ensaios eram utilizados os seguintes tampões:

HEPES (Sigma) 0,2 M.....pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5

Glicina/NaOH 0,2 M.....pH 9,0; 9,5 e 10,0

Para os substratos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan faziam-se soluções estoques  $1,00 \times 10^{-2}$  M em sulfóxido de dimetila, no caso do Ac-Phe-Arg-Nan e em água destilada quando se utilizava o D-Val-Leu-Arg-Nan. Em seguida, diluíam-se estas soluções estoques nos tampões apropriados, de forma a se obter a concentração final teórica desejada. O ensaio da atividade enzimática era realizado conforme já descrito no item II.3.2.

Incubavam-se controles do substrato em cada pH.

A concentração real das soluções dos substratos era calculada após hidrólise total do substrato conforme descrito no item II.3.2.

Para cada substrato construía-se um gráfico locando-se na ordenada as velocidades obtidas e na abcissa os valores de pH utilizados.

#### II.5.2.2. Efeito do tempo de incubação sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana

As variações das velocidades de hidrólise dos substratos em função do tempo de incubação eram determinadas com os substratos nas concentrações reais de  $7,6 \times 10^{-6}$  M para o Ac-Phe-Arg-Nan e  $8,0 \times 10^{-6}$  M para o D-Val-Leu-Arg-Nan. As misturas da incubação continham 450,0  $\mu$ l da solução de substrato e 50  $\mu$ l da solução da enzima. As misturas eram incubadas em triplicatas a 37°C durante 5-35 min e a reação era paralisada pela adição de 50,0  $\mu$ l da solução de ácido acético a 60% (v/v). Em seguida, liam-se as absorvâncias das misturas de incubação a 410 nm.

Construía-se, então, um gráfico locando-se na ordenada os valores das leituras das absorvâncias em 410 nm e na abcissa os tempos de incubação. A velocidade inicial era calculada como a inclinação da reta na região onde a formação de produto era linear com o tempo.

### II.5.2.3. Efeito da variação da concentração de substrato sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana

Nestes experimentos as soluções estoques dos substratos eram diluídas em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 de forma que suas concentrações reais variassem de  $7,6 \times 10^{-6}$  M a  $6,08 \times 10^{-4}$  M para o Ac-Phe-Arg-Nan e de  $4,65 \times 10^{-6}$  M a  $6,4 \times 10^{-4}$  M para o D-Val-Leu-Arg-Nan.

As misturas de incubação continham 450  $\mu$ l da solução do substrato e 50  $\mu$ l da solução de enzima a 32 nM e 53 nM nos experimentos com o D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-Nan, respectivamente. As incubações, em triplicatas, eram feitas a 37°C, durante 12 min (D-Val-Leu-Arg-Nan) e 20 min (Ac-Phe-Arg-Nan) nos quais a formação de produto era linear com o tempo. A reação era paralisada pela adição de 50  $\mu$ l de solução de ácido acético a 60% (v/v) e as absorvâncias das misturas de incubação eram lidas em 410 nm e transformadas em  $\mu$ M de p-nitroanilina liberada por minuto, conforme descrito no item II.5.1.

Com as velocidades obtidas eram construídos gráficos de Michaelis-Menten ( $v$  versus [S]), a partir dos quais obtinham-se informações a respeito do comportamento cinético da calicreína urinária humana com os substratos D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-Nan.

### II.5.3. Cinética da hidrólise dos substratos sintéticos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe

#### II.5.3.1. Determinação dos coeficientes de extinção molar ( $\epsilon_M$ ) do Bz-Arg-OEt, benzoil-L-arginina (Bz-Arg), Tos-Arg-OMe e N $\alpha$ -p-toluenosulfonil-L-arginina (Tos-Arg)

Para a determinação dos coeficientes de extinção molar a Tos-Arg, o Tos-Arg-OMe, a Bz-Arg e o Bz-Arg-OEt (todos da Sigma), eram deixados previamente no dessecador, por 72 horas. Em seguida, preparavam-se soluções estoques, em água destilada, nas seguintes concentrações: Tos-Arg-OMe a  $5,0 \times 10^{-2}$  M, Bz-Arg-OEt a  $1,0 \times 10^{-3}$  M Tos-Arg e Bz-Arg a  $1,0 \times 10^{-2}$  M. Estas soluções eram diluídas em tampão glicina-HCl 0,2 M pH 3,5 numa faixa de concentração que variava de  $1,0 \times 10^{-3}$  M a  $1,0 \times 10^{-4}$  M e, em seguida, faziam-se leituras das absorvâncias das soluções do Tos-Arg-OMe e Tos-Arg em 247 nm, e, do Bz-Arg-OEt e Bz-Arg em 253 nm.

O espectrofotômetro era zerado com tampão glicina-HCl 0,2 M, pH 3,5 utilizando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. Após as leituras das absorvâncias, construíam-se os gráficos locando-se nas ordenadas as concentrações molares das soluções dos reagentes e nas abcissas as respectivas absorvâncias. Assim, o  $\epsilon_M$  para cada composto era estimado como a inclinação da reta obtida, de acordo com a Lei de LAMBERT-BEER.

### II.5.3.2. Efeito do pH sobre as velocidades de hidrólise dos substratos sintéticos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe, catalisadas pela calicreína urinária humana

A atividade esterásica da calicreína urinária humana com os substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe era dosada espectrofotometricamente segundo o método descrito por HUMMEL (1959). Para tanto preparavam-se soluções estoques (0,01 M) dos referidos substratos, em água destilada que, em seguida, eram diluídas nos tampões apropriados de forma que a concentração teórica final do substrato fosse de  $1,0 \times 10^{-3}$  M, conforme descrito no item II.5.2.1. As misturas de incubação, em triplicatas, continham 1,0 ml de substrato e 50  $\mu$ l da solução de enzima a 64 nM. As misturas eram incubadas a 37°C e a reação paralisada pela adição de 100  $\mu$ l da solução de ácido acético a 60% (v/v). A seguir, liam-se as absorvâncias das misturas de incubação em 253 nm e 247 nm para Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe, respectivamente.

Faziam-se controles dos substratos em cada pH.

A concentração molar real das soluções dos substratos era calculada após hidrólise total dos substratos pela  $\beta$ -tripsina, conforme descrito no item II.3.2.

Para cada substrato construía-se um gráfico locando-se na ordenada as absorvâncias obtidas nos respectivos comprimentos de onda e na abscissa os valores de pH utilizados.

### II.5.3.3. Efeito do tempo de incubação sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe catalisadas pela calicreína urinária humana

As velocidades de hidrólise dos substratos catalisadas pela calicreína urinária humana em função do tempo eram determinadas nas concentrações  $2,0 \times 10^{-4}$  M e  $2,5 \times 10^{-4}$  M para o BzA-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe, respectivamente. A mistura de incubação continha: 1,0 ml da solução do substrato em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5 e em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, para Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe, respectivamente, e 50  $\mu$ l da solução de enzima a 64 nM. As misturas eram incubadas em triplicatas a 37°C durante 5-35 min e a reação era interrompida pela adição de 100  $\mu$ l de solução de ácido acético a 60% (v/v). As absorvâncias das incubações eram lidas em 253 nm para a experiência com Bz-Arg-OEt e em 247 nm para a experiência com Tos-Arg-OMe. Construíam-se gráficos locando-se nas ordenadas as absorvâncias em 253 nm e 247 nm e nas abcissas os respectivos tempos de incubação.

As velocidades iniciais eram calculadas como as inclinações das retas nas regiões onde a formação dos produtos era linear com o tempo.

#### II.5.3.4. Efeito da variação da concentração de substrato sobre as velocidades de hidrólise dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe catalisadas pela calicreína urinária humana

As soluções de uso dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe eram preparadas por diluições das soluções estoques, preparadas em água destilada, nos tampões Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5 e glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, respectivamente. A concentração real, determinada após hidrólise total dos substratos variava de  $2,0 \times 10^{-4}$  M a  $3,0 \times 10^{-3}$  M.

As misturas de incubação continham 1,0 ml da solução do substrato e 50  $\mu$ l da solução de enzima a 64 nM. As incubações, em triplicatas, eram realizadas a 37°C, durante 20 minutos nos quais a formação de produtos era linear com o tempo. A reação era paralisada pela adição de 100  $\mu$ l de solução de ácido acético a 60% (v/v) e as absorvâncias das misturas eram lidas em 253 nm para o Bz-Arg-OEt e 247 nm para o Tos-Arg-OMe e transformadas em  $\mu$ M de benzoil-L-arginina e tosil-L-arginina liberados por min, utilizando-se a equação:

$$v = (\Delta A / \Delta \epsilon) \cdot (1,1) \cdot (1/t) \cdot 10^6$$

onde

$\Delta A$  = variação da absorvância da mistura de incubação nos comprimentos de onda 253 nm e 247 nm para Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe, respectivamente.

$\Delta \epsilon$  = diferença entre os coeficientes de extinção molar da Tos-Arg e Tos-Arg-OMe a 247 nm, e, da Bz-Arg e Bz-Arg-OEt a 253 nm.

1,1 = fator de correção do volume da mistura de reação para o volume final em que foi lida a absorvância.

1/t = inverso do tempo de incubação.

$10^6$  = fator de conversão de M para  $\mu\text{M}$ .

A concentração molar real dos substratos era calculada após hidrólise total da solução usada, por meio da equação:

$$C_{m \text{ real}} = \Delta A / \Delta \epsilon \cdot d$$

onde

$\Delta A$  = diferença das absorvâncias entre Tos-Arg e Tos-Arg-OMe em 247 nm e entre Bz-Arg e Bz-Arg-OEt em 253 nm.

$\Delta \epsilon$  = diferença dos coeficientes de extinção molar entre Tos-Arg e Tos-Arg-OMe em 247nm e entre Bz-Arg e Bz-Arg-OEt em 253 nm.

d = caminho óptico = 1,0 cm

Para as reações das hidrólises totais, as soluções estoques dos substratos, Tos-Arg-OMe e Bz-Arg-OEt, eram diluídas em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 10,0 e lidas imediatamente as suas absorvâncias em 247 nm e 253 nm,

respectivamente (controle da absorvâncias dos substratos). Em seguida, fazia-se a incubação destas soluções a 37°C durante 6 horas e interrompia-se a reação pela adição de solução de ácido acético a 60% (v/v). Finalmente, liam-se as absorvâncias das reações nos respectivos comprimentos de onda e faziam-se os cálculos das concentrações molares reais dos substratos.

#### II.5.4. Estudos de inibição da atividade esterásica da calicreína urinária humana

##### II.5.4.1. Estudo dos efeitos de Bz-Arg e etanol sobre a atividade esterásica da calicreína urinária humana com o substrato Bz-Arg-OEt

Na realização destes estudos eram utilizadas concentrações equimoleculares de Bz-Arg e etanol. Para tanto pré-incubavam-se, em triplicata, 200 µl de Bz-Arg a 1,0 mM com 200 µl de etanol a 1,0 mM e 600 µl de Bz-Arg-OEt ( 1.330 µM em Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5) a 37°C durante 5,0 minutos. Adicionavam-se, então, 50 µl da solução de calicreína urinária humana a 64 nM e incubava-se a mistura por 20 minutos a 37°C. A reação era interrompida pela adição de 100 µl de ácido acético a 60% (v/v) e as absorvâncias das misturas eram lidas em 253 nm e transformadas em benzoil-L-

arginina liberada por minuto, conforme descrito no item II.5.3.4.

Para comparação dos efeitos de inibição era realizado um experimento controle onde a Bz-Arg e o etanol eram substituídos pelo tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,5.

#### II.5.5. Estudos da inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana.

##### II.5.5.1. Estudos da inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana pela aprotinina.

Para a realização destes experimentos faziam-se pré-incubações da calicreína urinária humana com aprotinina, a 37°C durante 15 minutos e, em seguida, dosava-se a atividade amidásica residual da enzima com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0. As misturas de pré-incubação, em triplicata, continham: 50 µl da solução de enzima a 40 nM e 50 µl da solução de aprotinina em concentração variando de 10 a 150 nM no tampão. O controle continha 50 µl do tampão em substituição à solução de aprotinina.

A seguir adicionavam-se a cada mistura 400 µl da solução do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, em concentração variando de 12,5 a 25 µM, previamente equilibrada a 37°C.

As incubações, em triplicatas, eram realizadas a 37°C durante 5-10 min. A reação era paralisada pela adição de 50  $\mu$ l da solução de ácido acético a 60% (v/v) e liam-se as absorvâncias das misturas em 410 nm. As leituras eram convertidas em  $\mu$ M de p-Nan/min, de acordo com a equação já descrita no item II.5.1. Com os valores de  $K_{i\text{ ap}}$  construía-se um gráfico de  $K_i$  versus [substrato]. De acordo com DIXON (1972) o intercepto desta reta com a ordenada fornece o valor de  $K_i$  quando a inibição é do tipo competitiva.

Com as velocidades residuais obtidas traçavam-se gráficos de  $v$  versus [aprotinina], obtendo-se assim, um gráfico para cada concentração de substrato (DIXON, 1972). Traçando-se retas de  $v_0$  (velocidade da reação sem inibidor) até os pontos  $v_0/4$ ,  $v_0/3$  e  $v_0/2$ , obtinham-se os valores de  $K_i$  aparente que são dados pela distância entre os pontos de interseção na abcissa de duas retas adjacentes, conforme descrito no item II.5.1. Com os valores de  $K_i$  aparente construía-se um gráfico de  $K_{i\text{ app}}$  versus [substrato]. De acordo com DIXON (1972) o intercepto desta reta com a ordenada fornece o valor de  $K_i$  quando a inibição é do tipo competitiva.

### II.5.5.2. Estudos da inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana pela benzamidina

Nestes experimentos faziam-se pré-incubações da calicreína urinária humana com a benzamidina, a 37°C durante 15 minutos e, em seguida, dosava-se a atividade amidásica residual da enzima com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0. As misturas de pré-incubação, em triplicatas, continham 50 µl da solução de enzima a 40 nM e 50 µl da solução de benzamidina em concentrações de 20, 40 e 80 mM no tampão. O controle continha 50 µl do tampão em substituição à solução de benzamidina.

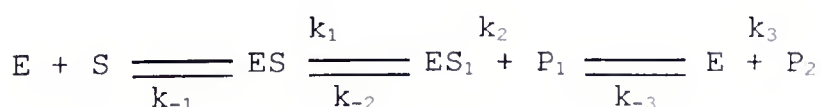
Após a pré-incubação adicionavam-se a cada mistura 400 µl da solução de substrato, previamente equilibrada a 37°C, cujas concentrações variavam de 40 a 125 µM. As misturas, em triplicatas, eram incubadas a 37°C durante 7 min. A reação era paralisada pela adição de 50 µl da solução de ácido acético a 60% (v/v). As absorvâncias das misturas eram lidas em 410 nm e convertidas em µM de p-Nan/min, conforme descrito no item II.5.1.

As concentrações reais das soluções de benzamidina eram calculadas dividindo-se as absorvâncias das soluções obtidas em 225 nm ( $\lambda_{\max}$ ) pelo coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_M$  em 225 nm = 9390 M<sup>-1</sup> . cm<sup>-1</sup>) (ROGANA et al., 1975).

Com os dados experimentais eram construídos gráficos de  $v$  versus  $[S]$  na ausência e na presença de diferentes concentrações do inibidor.

#### II.5.6. Determinação dos parâmetros cinéticos para as hidrólises de substratos sintéticos catalisadas pela calicreína urinária humana

Para os cálculos dos parâmetros cinéticos seguiu-se o modelo clássico para ação das enzimas proteolíticas segundo GUTFREUND & STURTEVANT (1956), citados por FUNATSU et al. (1972).



Segundo este modelo, para a hidrólise de éster, a etapa mais lenta é a desacilação ( $k_3$ ) e para a hidrólise de amida, como as p-nitroanilidas, a etapa determinante é a de acilação ( $k_2$ ). Assim,  $k_{cat} = k_2/E_0$  para as p-nitroanilidas e para os substratos do tipo éster,  $k_{cat} = k_3/E_0$ .

Quando o substrato é p-nitroanilida  $K_m$  pode ser tomado como uma medida de  $K_s$ , pois:

$$K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1, \quad \text{como } k_{-1} \gg k_2 \quad \text{assim,}$$

$$K_m = K_s = k_{-1}/k_1$$

Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  tanto para os substratos do tipo 4-nitroanilida como para os substratos do tipo éster

eram calculados por tratamento dos dados pelo método dos mínimos quadrados com pesos estatísticos, como proposto por WILKINSON (1961), usando-se o programa SICEB (Sistema para Cálculos Estatísticos Em Bioquímica) (JUNQUEIRA, 1992).

### III - RESULTADOS

#### III.1. Purificação da calicreína urinária humana

A purificação da calicreína urinária humana era realizada em três etapas: a) precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall; b) concentração da urina com o gel poli(N-isopropilacrilamida) seguida de diálise e liofilização e c) cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina.

Está representado na Figura 4 o fluxograma da purificação da calicreína urinária humana, onde estão incluídas todas as etapas envolvidas.

ETAPA 1 - O primeiro grande passo na simplificação do processo de purificação da calicreína urinária humana foi a precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall antes da concentração da urina utilizando-se o gel poli (N-isopropilacrilamida) (ítem II.1.2). Com a separação desta proteína a concentração da urina tornou-se um processo fácil e rotineiramente executável no laboratório.

A atividade amidásica específica sobre o substrato Ac-Phe-Arg-Nan tanto na urina fresca como após a precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall era de  $3,67 \times 10^{-3}$  mM.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

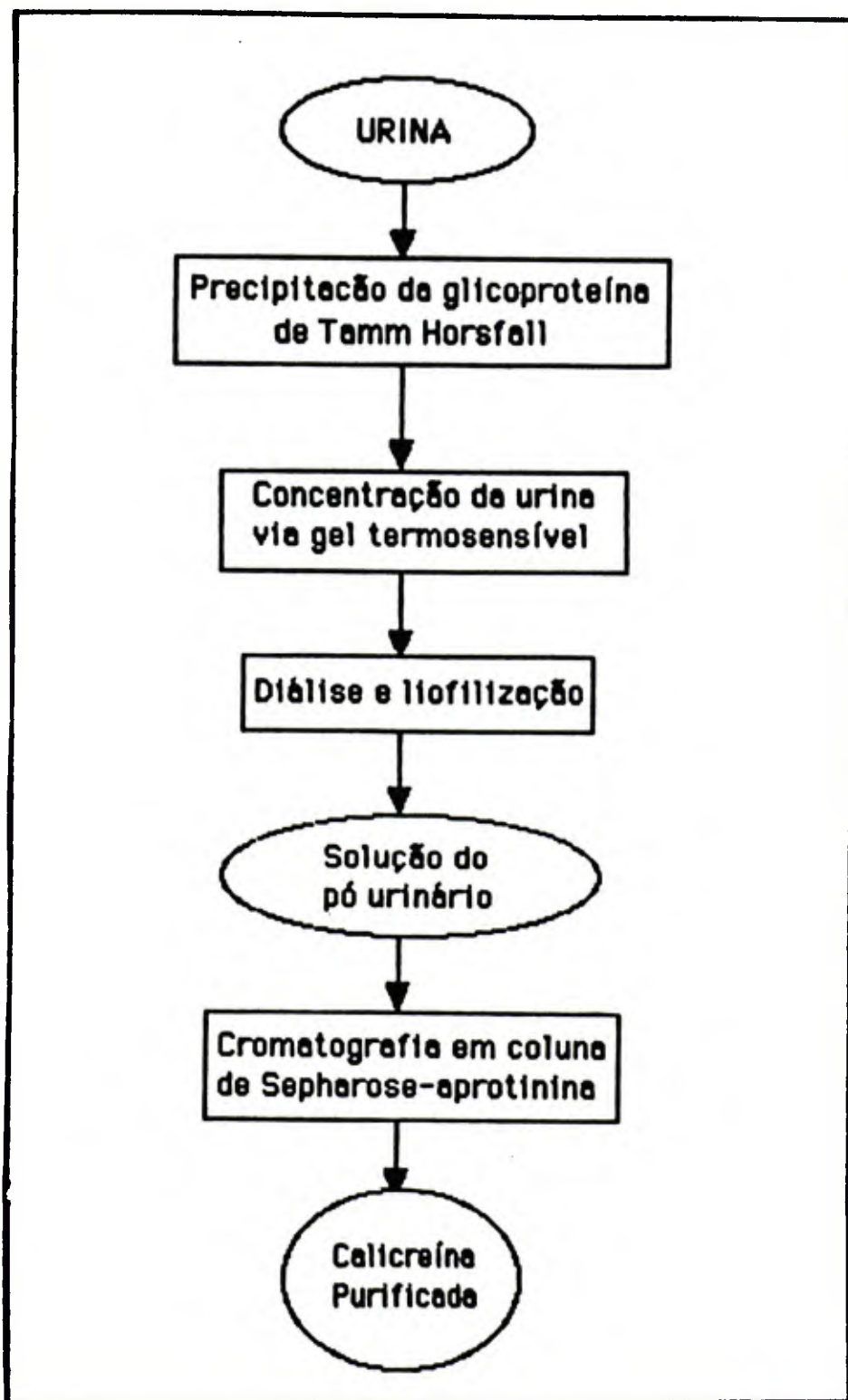


FIGURA 4 - Fluxograma esquemático da purificação da calicreína urinária humana.

ETAPA 2 - após a precipitação da glicoproteína a urina era concentrada com o gel poli(N-isopropilacrilamida) (item II.1.3) e submetida a diálise e liofilização (item II.1.4). com o pó urinário obtido era preparado o extrato bruto (item II.2.1) que apresentava uma atividade amidásica específica sobre o substrato de  $6,30 \times 10^{-3} \text{ mM} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , correspondendo a um fator de purificação de 1,9 vezes e com um rendimento de 76%.

ETAPA 3 - A terceira etapa consistia na cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina. Na Figura 5 é apresentado o perfil desta cromatografia. Nesta etapa era separada uma grande quantidade de proteínas inativas, que não se combinavam com a aprotinina, como pode ser visto na figura (primeiro pico), o que possibilitou um aumento de 903 vezes na atividade amidásica específica, com recuperação de 33% da atividade .

Assim, partindo-se de 1350 mg de proteína em 30 litros de urina, eram obtidos 440  $\mu\text{g}$  de calicreína urinária humana purificada.

Está apresentado na Tabela 1 o sumário dos processos utilizados na purificação da calicreína urinária humana, usando-se como substrato para dosagem da atividade amidásica específica, o Ac-Phe-Arg-Nan.

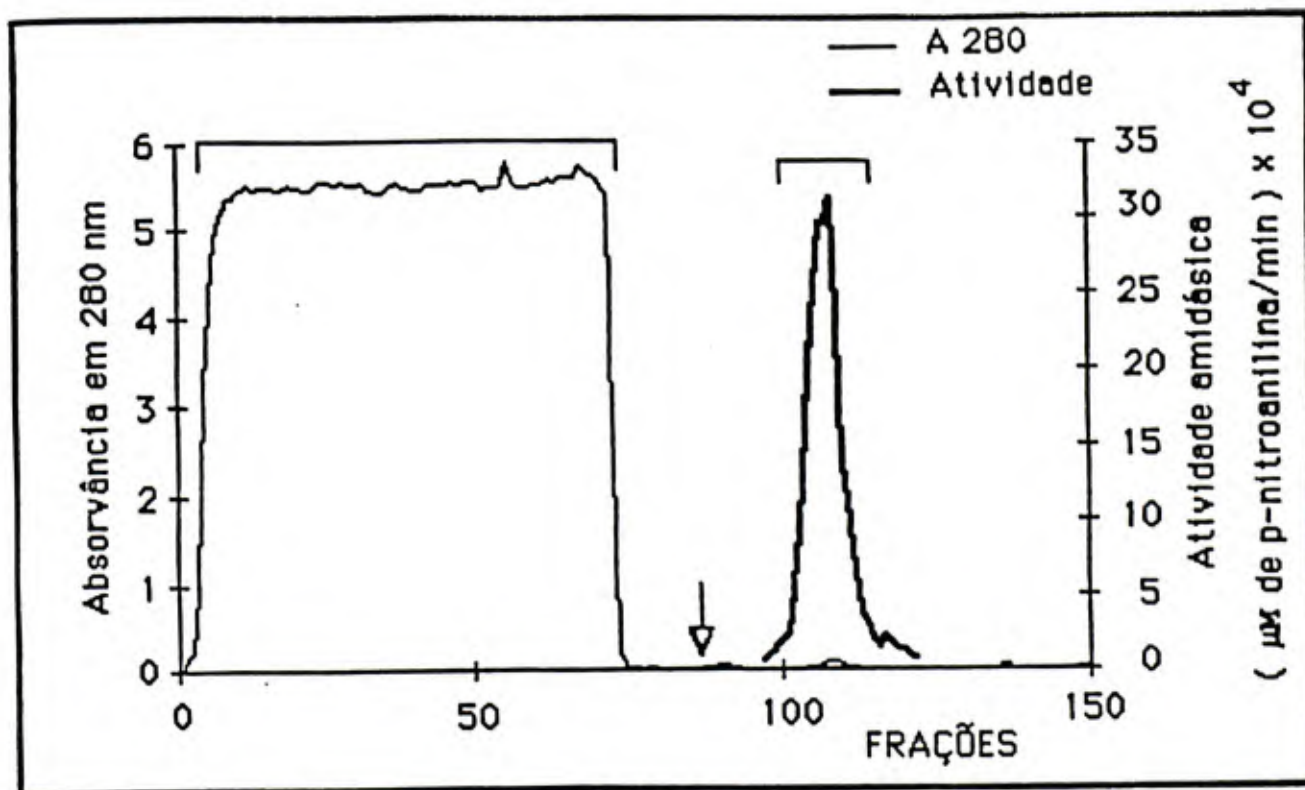


FIGURA 5 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina.

**Condições** : Coluna de (2,5 x 9,2) cm, equilibrada com tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, contendo NaCl 0,75 M e azida sódica 0,05%. A amostra aplicada - extrato bruto - continha 530 mg de proteínas. A coluna era lavada com o tampão de equilíbrio e a calicreína era eluída através, de aplicação do tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 3,5, contendo NaCl 1,0 M e azida sódica 0,05%. A seta indica o início da eluição. Durante a eluição, as frações eram coletadas em tubos contendo 0,5 ml de Tris-HCl 2 M pH 8,5. A cromatografia era realizada a 4°C coletando-se frações de 10 ml durante a lavagem da coluna e 2,0 ml durante a eluição. Foram aplicados à coluna 103 ml da solução do extrato bruto. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.2.2.

**TABELA 1** - Purificação da calicreína urinária humana, usando-se Ac-Phe-Arg-Nan como substrato para a medida da atividade amidásica.

TRATAMENTO	PROTEÍNA (mg)	ATIV. AMID. ESPECÍFICA (mM/mg.min)	ATIV. AMIDÁSICA TOTAL (mM/min)	FATOR PURIF.	RENDIM. ( % )
urina	1350	$3,67 \times 10^{-3}$	4,95	1	100
sobrenadante da precipit. da glicoprot. de Tamm- Horsfall	1200	$3,67 \times 10^{-3}$	4,40	1,13	89
extrato bruto	530	$6,30 \times 10^{-3}$	3,34	1,93	76
Sepharose- aprotinina	0,44	3,31	1,46	903,00	33

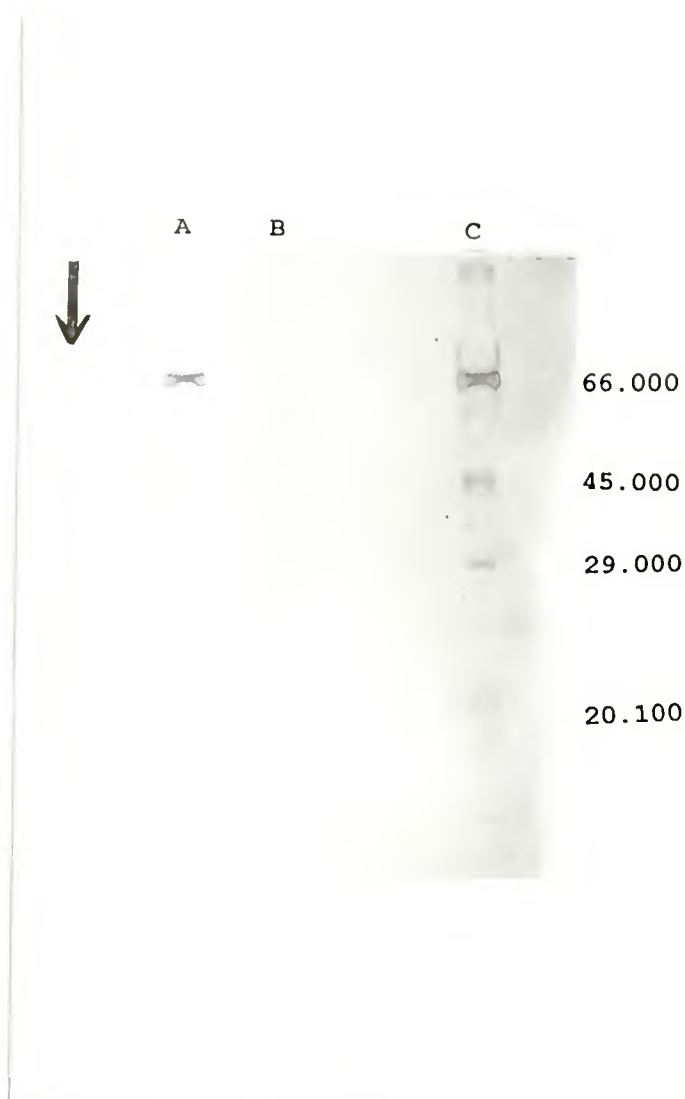
### III.2. Critérios de pureza

O perfil eletroforético da calicreína em gel de poliacrilamida a 12% contendo 0,1% de SDS é mostrado na Figura 6. Como pode ser observado a calicreína urinária humana apresenta apenas uma banda protéica, difusa, característica de glicoproteínas.

O perfil da cromatografia de exclusão molecular da calicreína urinária humana em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC é mostrado na Figura 7. Como pode-se observar, o perfil mostra um único pico, simétrico quanto à absorção em 280 nm e com atividade enzimática totalmente superposta a ele, demonstrando, assim, a pureza da preparação de calicreína.

O perfil da cromatografia de fase reversa da calicreína urinária humana em coluna Poros (crosslinked Polystyrene/divinylbenzene) (4,6 x 100 mm) em equipamento HPLC é mostrado na Figura 8. Como pode ser observado o perfil mostra um único pico, evidenciando a pureza da preparação.

Está representado na Figura 9 o perfil da cromatografia de troca iônica da calicreína urinária humana em coluna Poros II Q/P (4,6 x 50 mm) em equipamento HPLC, apresentando, também, um único pico, constituindo-se em mais uma evidência da pureza da preparação.



**FIGURA 6** - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-mercaptoetanol.

**Condições** : Gel contendo 12% (p/v) de poliacrilamida e 0,1% (p/v) de SDS. Canaletas A e C : padrões de peso molecular (soroalbumina bovina: 66.000, ovalbumina: 45.000, anidrase carbônica: 29.000 e SBTI: 20.100 ). Canaleta B: calicreína urinária humana obtida da cromatografia em coluna de Sepharose aprotinina. Todas as amostras eram dissolvidas no tampão Tris-HCl 2,0 M, pH 6,8, contendo SDS 10%, 2-mercaptoetanol 5%. Amostras aplicadas: 1 - 5  $\mu$ g de proteínas. Gel corado pelo método da prata. Para maiores detalhes vide Metodologia, item II.3.3.

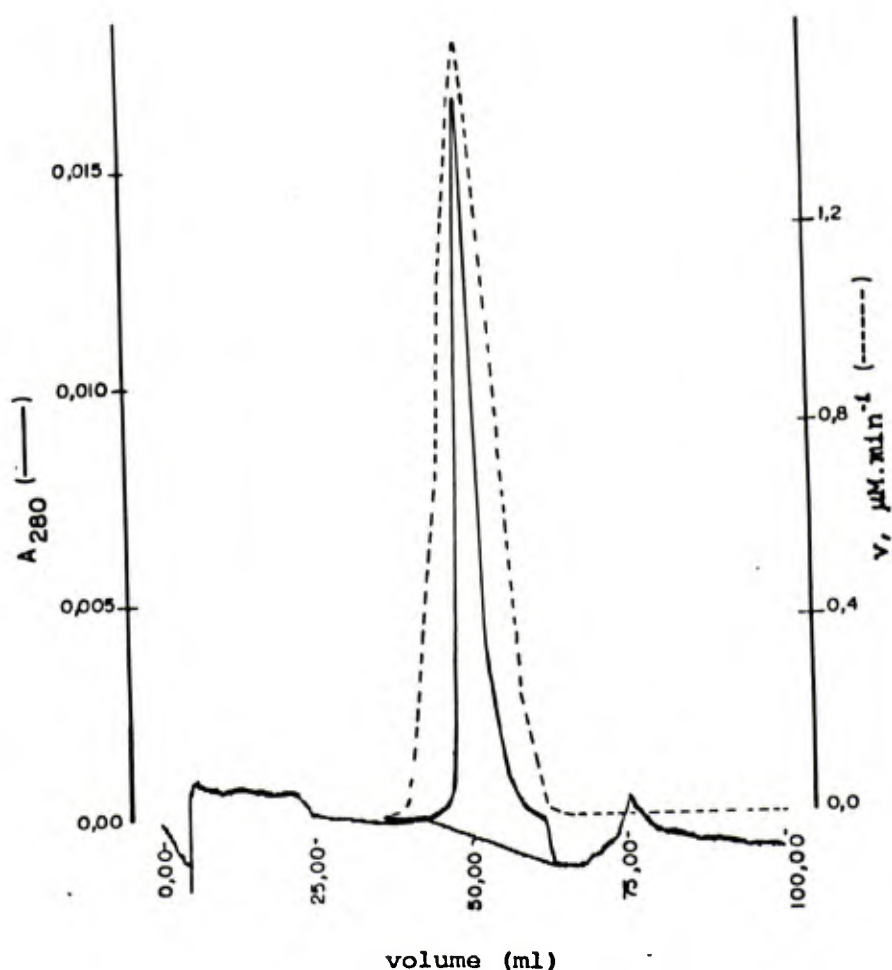
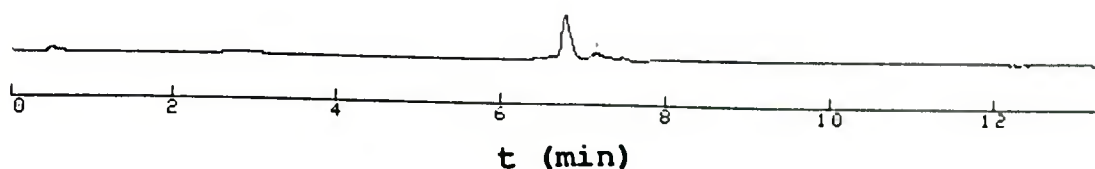


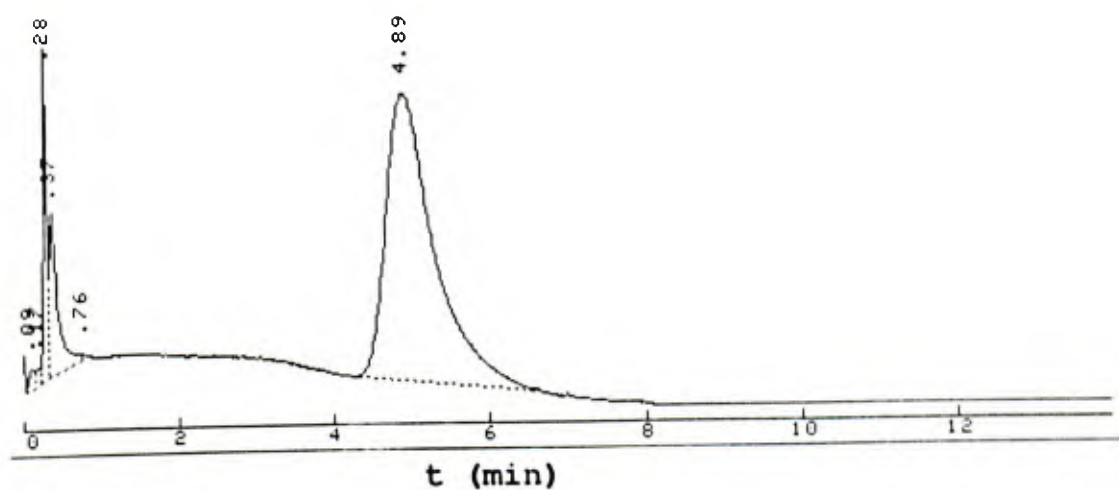
FIGURA 7 - Cromatografia em coluna Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC.

**Condições:** Coluna (10 X 300 mm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 50,0 mM, pH 6,5 contendo NaCl 0,1 M. Fluxo: 0.25 ml/min. Pressão 1,5 MPa. Padrões de peso molecular: soroalbumina bovina (PM = 66.000), ovalbumina (PM = 45.000), anidrase carbônica (PM = 29.000) e ribonuclease A (PM = 13.700) dissolvidos em tampão de equilíbrio na concentração de 1,0 mg/ml. Quantidade de proteína aplicada : 8,8 μg. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.4.2.2.



**FIGURA 8** - Cromatografia de fase reversa em equipamento HPLC

**Condições:** Coluna Poros (crosslinked Polystyrene/divinylbenzene) (4,6 x 100 mM) equilibrada em ácido trifluoracético 0,1% e acetonitrila 3%. Eluição com gradiente linear até 70% de acetonitrila, contendo 0,1% de ácido trifluoracético. Fluxo: 3,0 ml/min. Quantidade de proteína aplicada: 4,4 µg. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.3.4.



**FIGURA 9** - Cromatografia de troca iônica em equipamento HPLC

Condições: Coluna Poros IIQ/P (4,6 x 50 mm) equilibrada em tampão borato de sódio 0,05 M, pH 9,0. Eluição com gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0 M. Fluxo: 3,0 ml/min. Quantidade de proteína aplicada: 4,4 µg. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.3.5.

### III.3. Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-mercaptoetanol

Está representado na Figura 10 a curva padrão obtida no gráfico dos logaritmos dos PM dos padrões em função de suas mobilidades eletroforéticas relativas. A mobilidade eletroforética relativa da calicreína urinária humana foi de 0,52 correspondendo portanto, ao peso molecular estimado de 31.000.

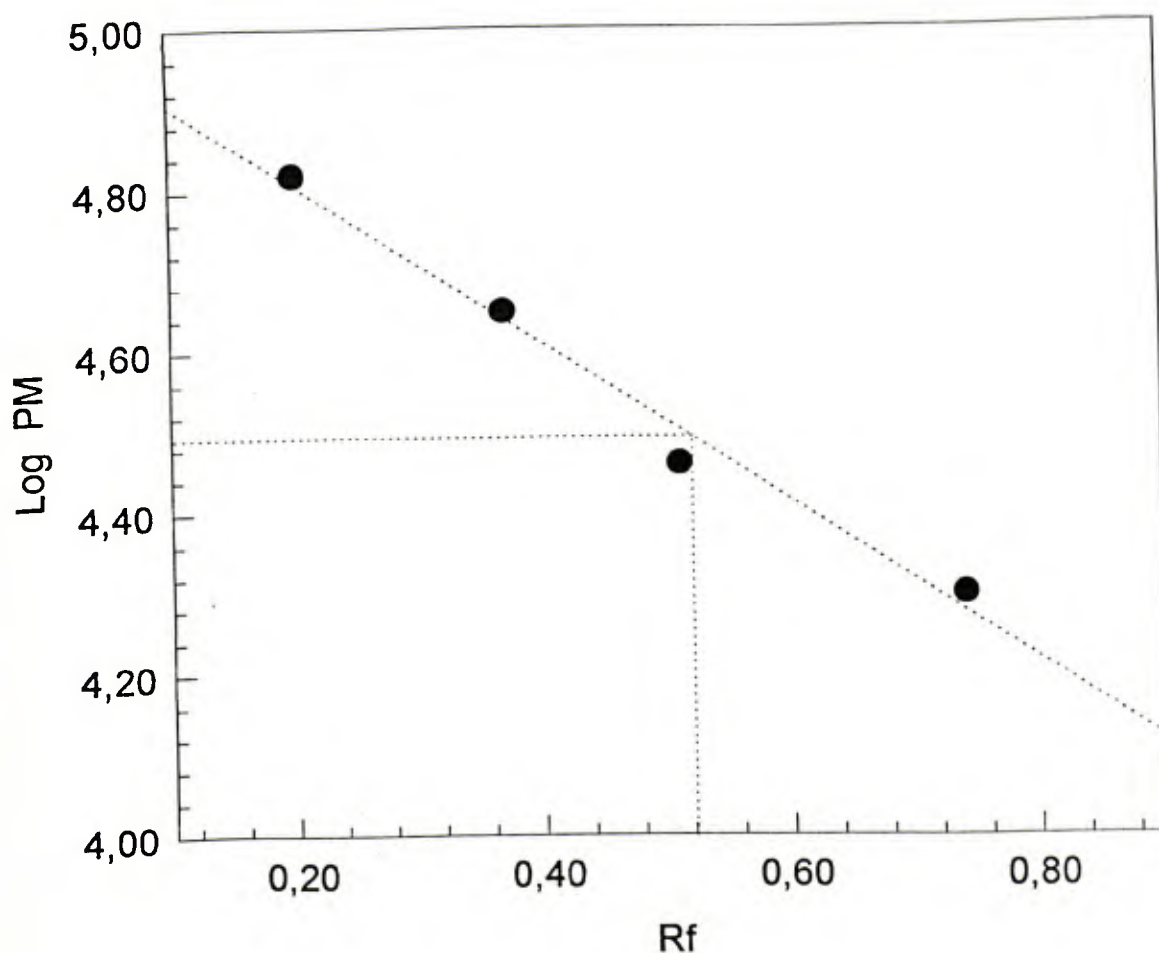
### III.4. Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana por cromatografia de exclusão molecular

A reta obtida no gráfico dos logaritmos dos PM dos padrões em função de seus respectivos  $k_{av}$  determinados por cromatografia de filtração molecular é mostrada na Figura 11. O valor de  $k_{av}$  obtido para a calicreína urinária humana foi de 0,331 correspondendo ao peso molecular aparente de 45.000.

A Tabela 2 resume algumas propriedades físico-químicas da calicreína urinária humana.

### III.5. Determinação da concentração molar de calicreína urinária humana ativa

Está representado na Figura 12 a variação da velocidade inicial de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana ( $v$ ) em função da concentração total do inibidor - aprotinina - em cinco concentrações do D-Val-Leu-Arg-Nan (10; 12,5; 15; 17,5 e 20  $\mu\text{M}$ ). A concentração molar da solução de enzima ativa foi obtida conforme descrito no item II.5.1. O valor encontrado para a concentração da enzima foi praticamente o mesmo em todas as concentrações do substrato utilizadas, sendo igual a 8,0 nM.

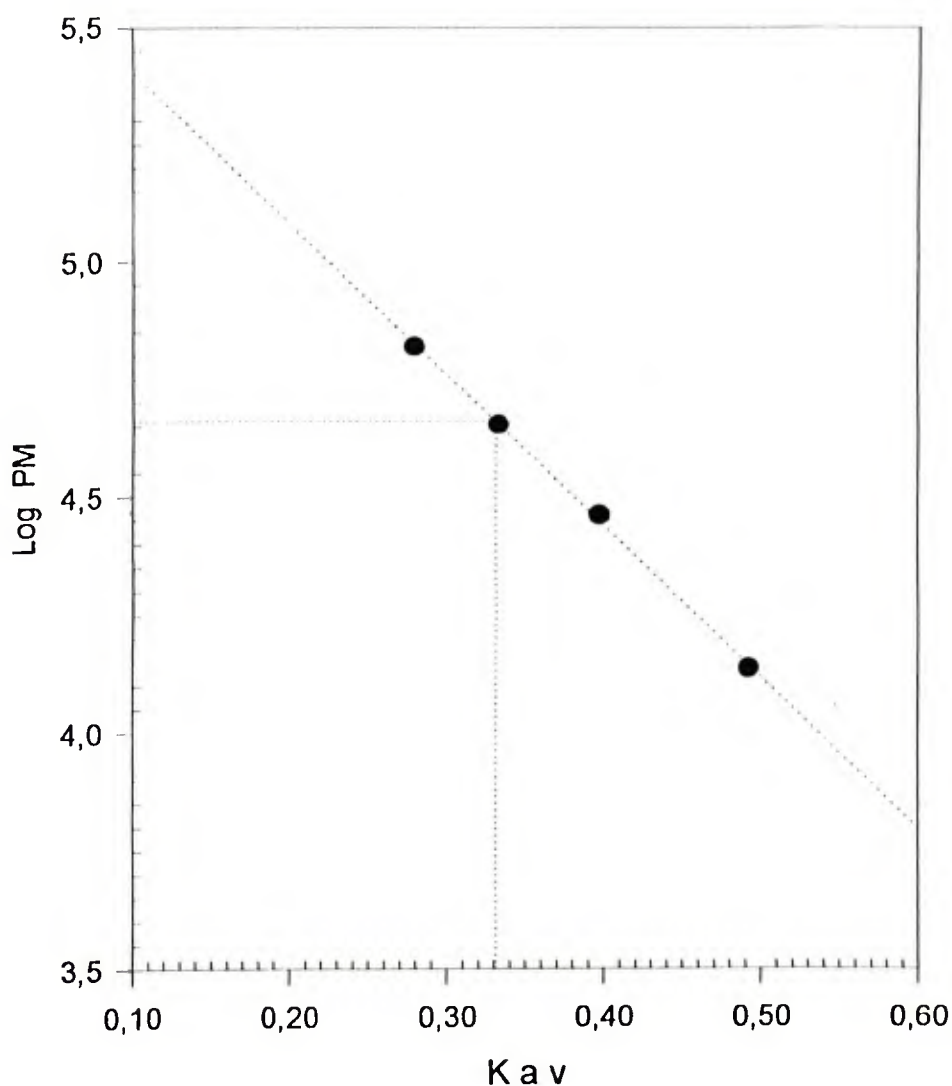


**Figura 10** - Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-mercaptoetanol.

**Condições** : Géis de placa contendo 12% (p/v) de poliacrilamida e 0,1% (p/v) de SDS e 5% de 2-mercaptoetanol. Padrões de peso molecular: soroalbumina bovina ( $R_f = 0,20$ ), ovalbumina ( $R_f = 0,37$ ), anidrase carbônica ( $R_f = 0,51$ ) e SBTI ( $R_f = 0,74$ ). Todas as amostras eram dissolvidas em tampão Tris-HCl 2.0 M, pH 6,8, contendo 10% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 60% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol. Quantidade de proteína aplicada: 1- 5,0  $\mu\text{g}$ . Peso molecular estimado para a calicreína urinária humana ( $R_f = 0,52$ ) = 31.000.

Equação da reta:  $Y = (-9,811 \cdot 10^{-1} \pm 0,091)X + (5,004 \pm 0,045)$   
 $R = 0,9914$ .

Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.4.1.



**FIGURA 11** - Determinação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC.

**Condições:** Coluna (10 X 300 mm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 50,0 mM pH 6,5 contendo NaCl 0,1 M. Fluxo: 0,25 ml/min. Pressão: 1,5 MPa. Padrões de peso molecular: soroalbumina bovina ( $k_{av} = 0,280$ ), ovalbumina ( $k_{av} = 0,333$ ), anidrase carbônica ( $k_{av} = 0,397$ ) e ribonuclease A ( $k_{av} = 0,492$ ) dissolvidos no tampão de equilíbrio na concentração de 1,0 mg/ml. Quantidade de proteína aplicada: 8,8  $\mu$ g. Peso molecular determinado para a calicreína urinária humana ( $k_{av} = 0,331$ ): 45.000.

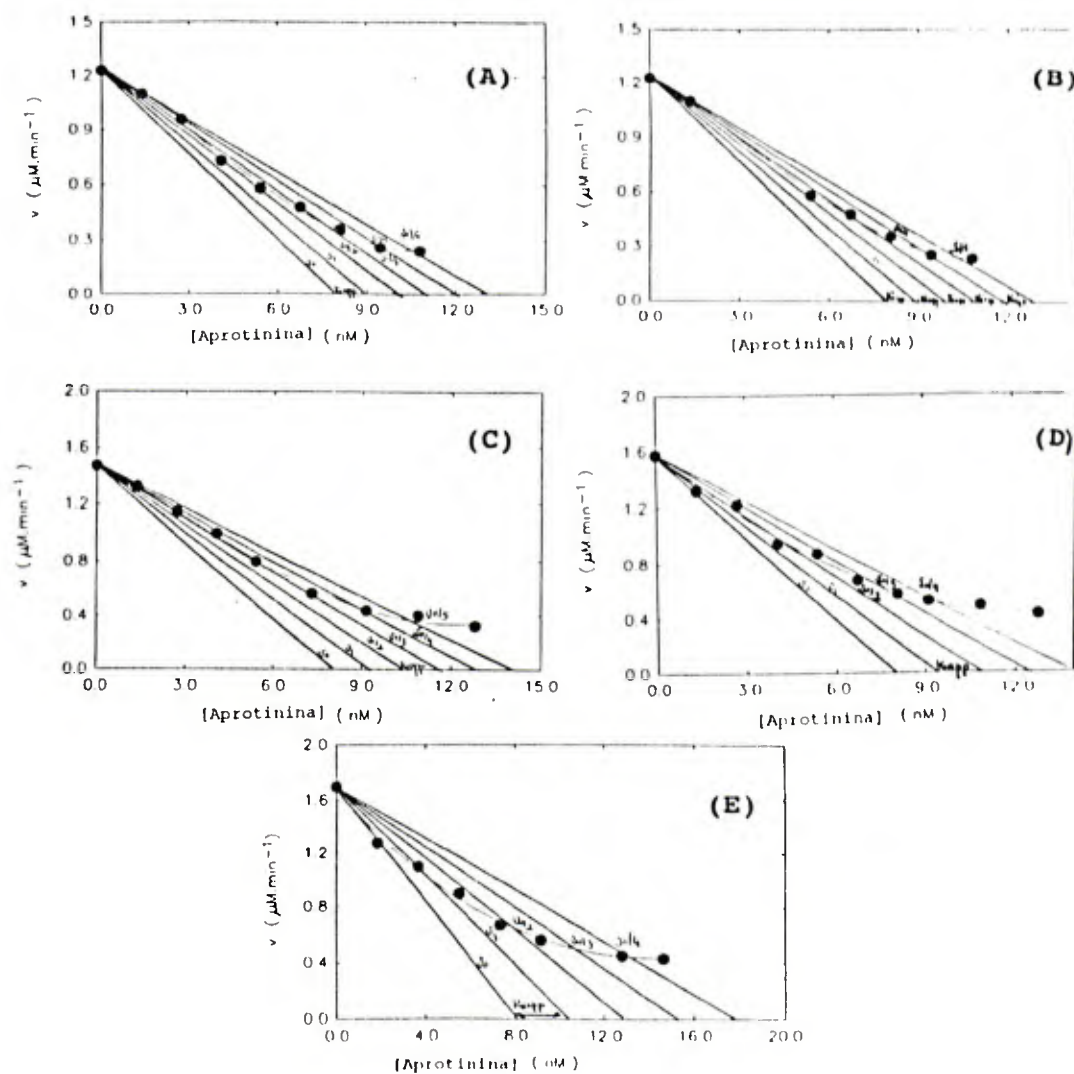
Equação da reta de calibração da coluna:  $Y = (-3,21 \pm 0,070) X + (5,72 \pm 0,027)$ ,  $R = 0,999$ . Para maiores detalhes vide Metodologia, item II.4.1.

**TABELA 2** - Algumas propriedades físico-químicas da calicreína urinária humana.

---

peso molecular			ponto isoeletrico
cromatografia em gel	eletroforese em SDS	titulação com aprotinina	
45.000	31.000	25.000	4,0

---



**FIGURA 12** - Gráficos de DIXON (1972) para a determinação da concentração da enzima ativa ( $e_0$ ) e  $K_i$  aparente.

**Condições:** [D-Val-Leu-Arg-Nan]: (A)  $10,0 \mu\text{M}$ , (B)  $12,5 \mu\text{M}$ , (C)  $15,0 \mu\text{M}$ , (D)  $17,5 \mu\text{M}$  e (E)  $20,0 \mu\text{M}$ . Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.1.

### III.6. Caracterização cinética da calicreína urinária humana

#### III.6.1. Cinética da hidrólise de substratos do tipo 4-nitroanilida

##### III.6.1.1. Cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg- Nan

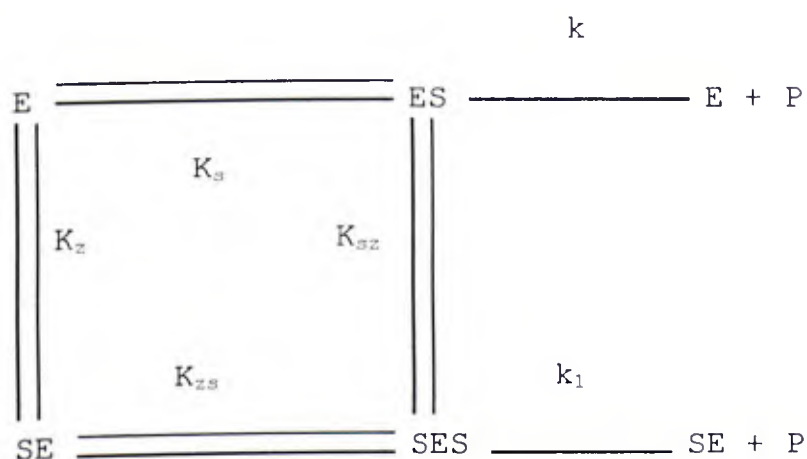
O efeito do pH sobre a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana é mostrado na Figura 13. O pH ótimo para a hidrólise deste substrato foi 9,0.

O efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana está apresentado na Figura 14. Observa-se que a reta é tangente à curva de tempo até aproximadamente 20 minutos. A concentração real do substrato foi de  $8,0 \times 10^{-6}$  M, uma das menores concentrações deste substrato utilizadas no experimento para a determinação de  $K_m$  e  $V_{max}$ .

Na Figura 15 está representado o gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana. Como pode-se observar a hidrólise desse substrato não obedece à cinética de Michaelis-Menten (curva 2) em toda a faixa de concentração do substrato utilizada, apresentando um

ligeiro desvio da hipérbole teórica em concentrações mais altas do substrato.

O modelo cinético proposto para o comportamento observado é representado a seguir:



onde

$K_s$  = Constante de dissociação do substrato do sítio ativo (complexo ES).

$K_z$  = Constante de dissociação do substrato do sítio ativador (complexo SE).

$K_{sz}$  = Constante de dissociação do substrato do sítio ativador (complexo SES).

$K_{zs}$  = Constante de dissociação do substrato do sítio ativo (complexo SES).

$k$  = Constante catalítica para quebra do complexo ES (do sítio ativo).

$k_1$  = Constante catalítica para quebra do complexo SES (do sítio ativador).

Este modelo fornece a seguinte equação de velocidade

$$\frac{v}{e_0} = \frac{k \cdot [S] + k_1 \cdot [S]^2 / K_{sz}}{K_s + (1 + K_s / K_z) \cdot [S] + [S]^2 / K_{sz}}$$

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente de acordo com PETERSSON & PETERSSON (1970) e ISQUIERDO et al. (1987). Segundo esses autores quase todos os sistemas enzimáticos apresentam equação de velocidade como uma razão de polinomiais:

$$v = \frac{\sum_{k=0}^d \alpha_k \cdot [R]^k}{1 + \sum_{k=1}^d \beta_k \cdot [R]^k}$$

onde

R = substrato, produto ou modificador

d = grau da polinomial

$\alpha_k$  e  $\beta_k$  = constantes cinéticas

Para se determinar o grau das polinomiais na equação de velocidade era realizado um teste estatístico t, pelo qual a contribuição de cada termo na polinomial era analisada.

De acordo com STERLING & POLLACK (1968) e BROWNLEE (1960) citados por PETERSSON & PETERSSON (1970) a importância de um determinado termo  $\alpha_k$  pode ser testada utilizando-se o teste estatístico t através da equação

$$\frac{\alpha_k}{S(\alpha_k)} = t \cdot (n - 2d - 1)$$

onde

$\alpha_k$  = coeficiente a ser testado.

$S(\alpha_k)$  = variância do coeficiente.

n = número de dados experimentais.

d = grau da polinomial.

Após ter-se o conhecimento dos termos relevantes nas polinomiais partiu-se para o ajuste dos dados cinéticos às equações de velocidade, com ordem (k) crescente, de forma que a soma dos quadrados dos resíduos fosse minimizada. Cada ajuste obtido era comparado com os ajustes anteriores. A decisão na escolha da equação que apresentou um melhor ajuste aos dados experimentais foi realizada pelo teste estatístico F, onde, de acordo com ISQUIERDO et al. (1987)

$$F = \frac{(Q_1/Q_2) / (m_2 - m_1)}{Q_2 / (n - m_2)}$$

onde:

$Q_1$  e  $Q_2$  = Soma dos quadrados dos resíduos dos respectivos modelos testados.

$m_1$  e  $m_2$  = Número de parâmetros correspondentes.

$n$  = Número de dados experimentais.

Os valores de  $F$  e  $t$  obtidos foram analisados frente aos valores tabelados (BEYER, 1983) a um grau de confiabilidade de 95%.

A análise estatística dos dados de  $v$  ( $[S]$ ) mostrou que a adição do termo  $[S]^3$  no numerador e de  $[S]^2$  no denominador da equação de velocidade não se justifica, pois essas hipóteses foram rejeitadas pelo teste estatístico  $t$  e os coeficientes obtidos no ajuste dos dados experimentais por regressão não linear à equação de velocidade foram negativos. Portanto, a equação de velocidade que melhor se ajustou aos dados experimentais possui um termo quadrático da concentração do substrato no numerador, indicando uma possível ativação pelo substrato. Na parte B da Figura 16 é mostrado o gráfico dos resíduos relativos obtidos para o ajuste dos dados experimentais à equação de velocidade em função da concentração do substrato. Como pode ser observado há uma distribuição aleatória dos resíduos.

A equação de velocidade obtida pelo ajuste dos dados experimentais é:

$$v = \frac{\alpha(S) + \beta(S)^2}{1 + \gamma(S)}$$

Os valores dos coeficientes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , obtidos pelo melhor ajuste dos dados experimentais para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana são apresentados na Tabela 3. Relacionando esses coeficientes com as constantes cinéticas da equação de velocidade descrita para o modelo proposto tem-se:

$$\alpha = k/K_s = (V_{\max}/e_0)/K_s$$

$$\beta = k_1/(K_s \times K_{sz})$$

$$\gamma = (1/K_s + 1/K_z)$$

Conhecendo-se o valor de  $K_s$ , calculado em baixas concentrações do substrato, os valores dos coeficientes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e assumindo-se  $K_z = K_{sz}$  e  $K_s = K_{zs}$  foi possível determinar todas as constantes cinéticas para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana. A Tabela 4 apresenta estes valores.

Os valores de  $K_s$  e  $V_{\max}$  foram calculados em baixas concentrações do substrato (0-80  $\mu\text{M}$ ), na região onde, aparentemente, não ocorre ativação pelo substrato, sendo iguais a  $12,22 \pm 0,61 \mu\text{M}$ ,  $2,72 \pm 0,04 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectivamente.

### III.6.1.2. Cinética da hidrólise do substrato Ac-Phe-Arg-Nan

O pH utilizado nos experimentos para a determinação dos parâmetros cinéticos para hidrólise do Ac-

Phe-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana foi 9,0 (LIMA, 1986).

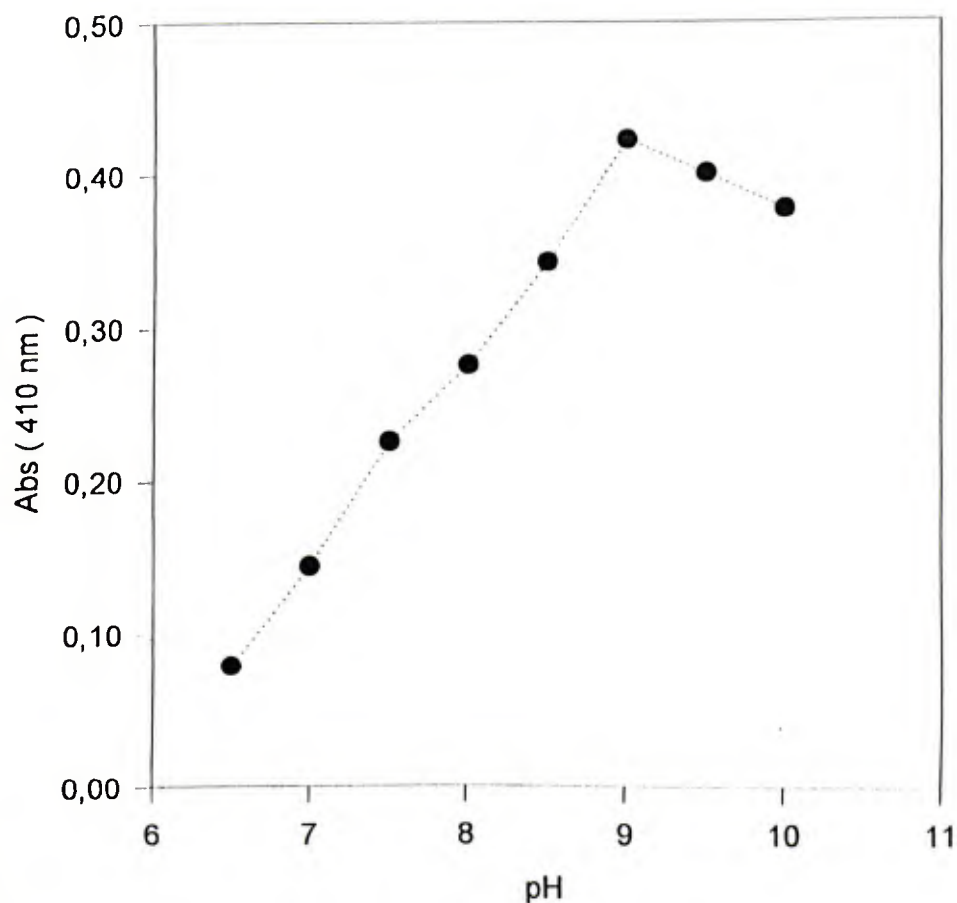
A determinação do efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de hidrólise do substrato Ac-Phe-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana, mostrou que a reta é tangente à curva de tempo até aproximadamente 20 minutos. A concentração real do substrato utilizada para a realização deste experimento foi de 7,6  $\mu\text{M}$ , a menor concentração do substrato utilizada no experimento para determinação de  $K_s$  e  $V_{\text{max}}$ .

Na Figura 16 está representado o gráfico de velocidade versus concentração do substrato para a hidrólise do substrato Ac-Phe-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana. A hidrólise deste substrato também não obedece à cinética de Michaelis-Menten em toda a faixa de concentração do substrato utilizada. A análise estatística dos dados mostrou que a equação que melhor se ajustou aos dados experimentais possui um termo quadrático para a concentração do substrato no numerador como mostrado no item II.6.1.1. A parte B da Figura 16 apresenta o gráfico dos resíduos obtidos no ajuste em função da concentração do substrato. Como pode ser observado, a distribuição dos resíduos é aleatória.

Os coeficientes obtidos no ajuste dos dados experimentais à equação de velocidade são apresentados na Tabela 3.

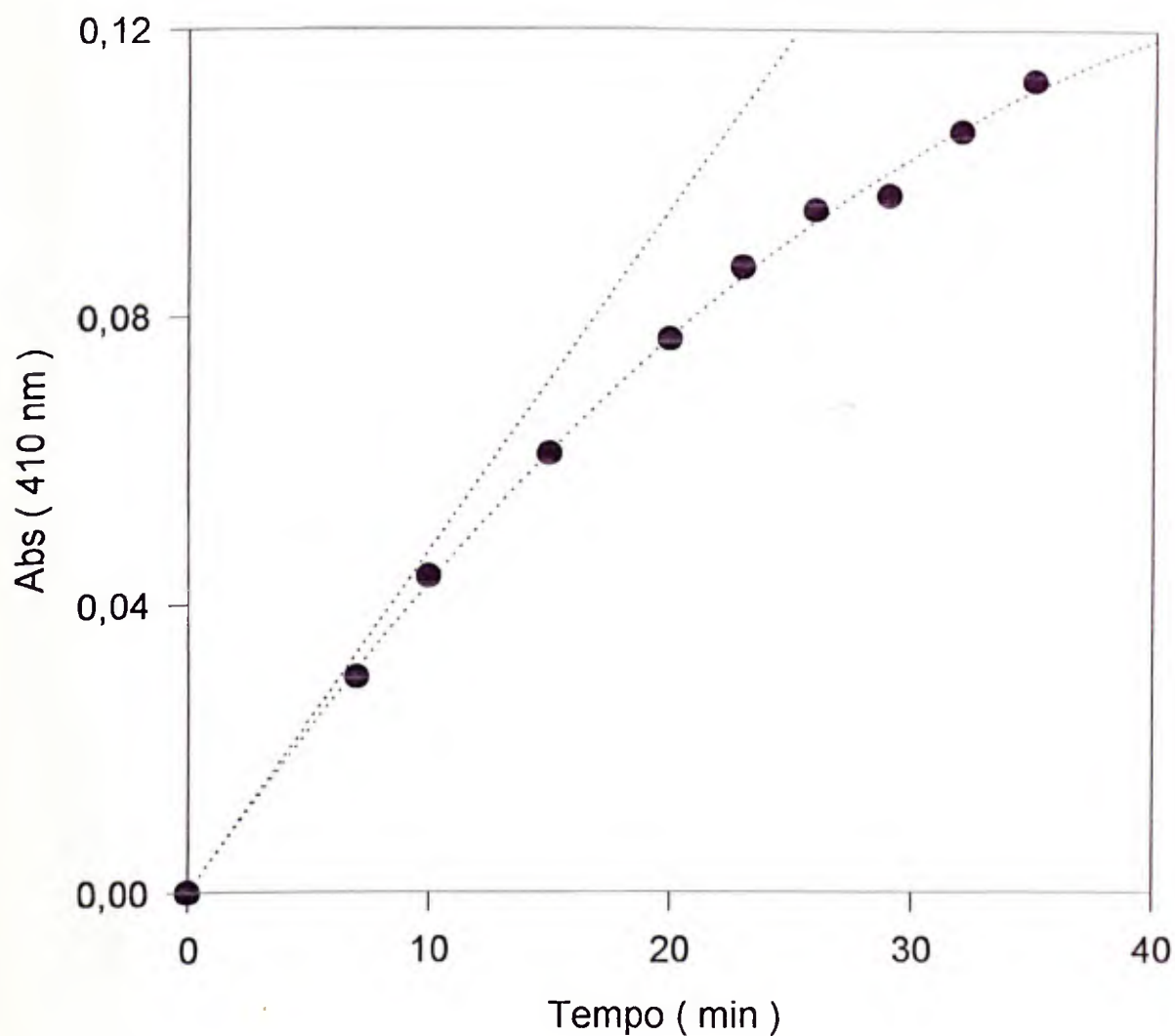
As constantes cinéticas para a hidrólise do substrato Ac-Phe-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana, calculadas como descrito para o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan no item III.6.1.1. são apresentadas na Tabela 4.

Os valores de  $K_s$  e  $V_{max}$  obtidos em baixas concentrações do substrato (0-80  $\mu\text{M}$ ), onde, aparentemente, não ocorre ativação pelo substrato, foram, respectivamente,  $14,70 \pm 0,88 \mu\text{M}$  e  $0,57 \pm 0,01 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ .



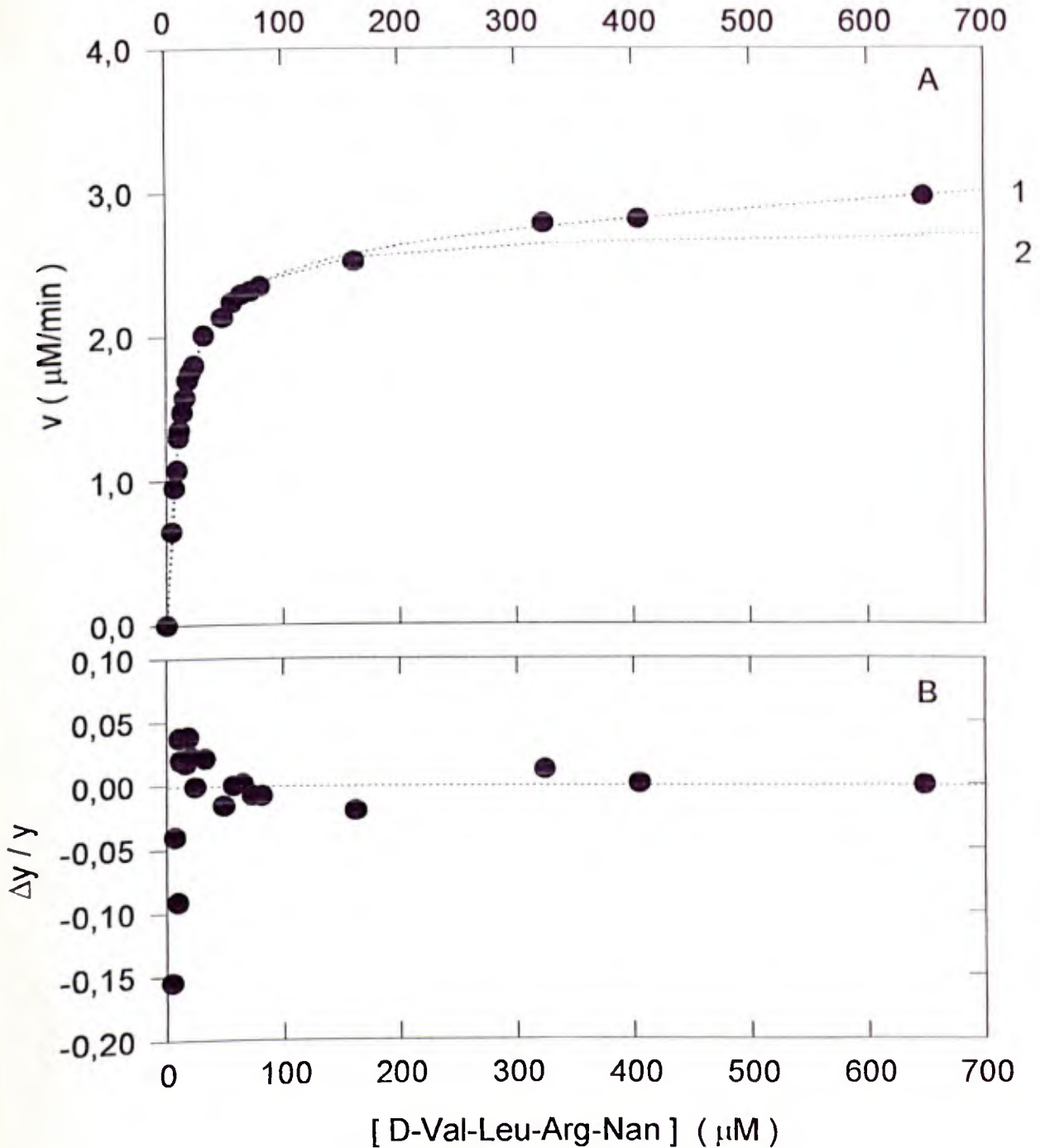
**FIGURA 13** - Efeito do pH sobre a velocidade de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana.

**Condições:** D-Val-Leu-Arg-Nan  $1 \times 10^{-3}$  M preparado em tampões de diferentes pHs. Calicreína urinária humana  $2,0 \mu\text{g}$ . Incubação: 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.2.1.



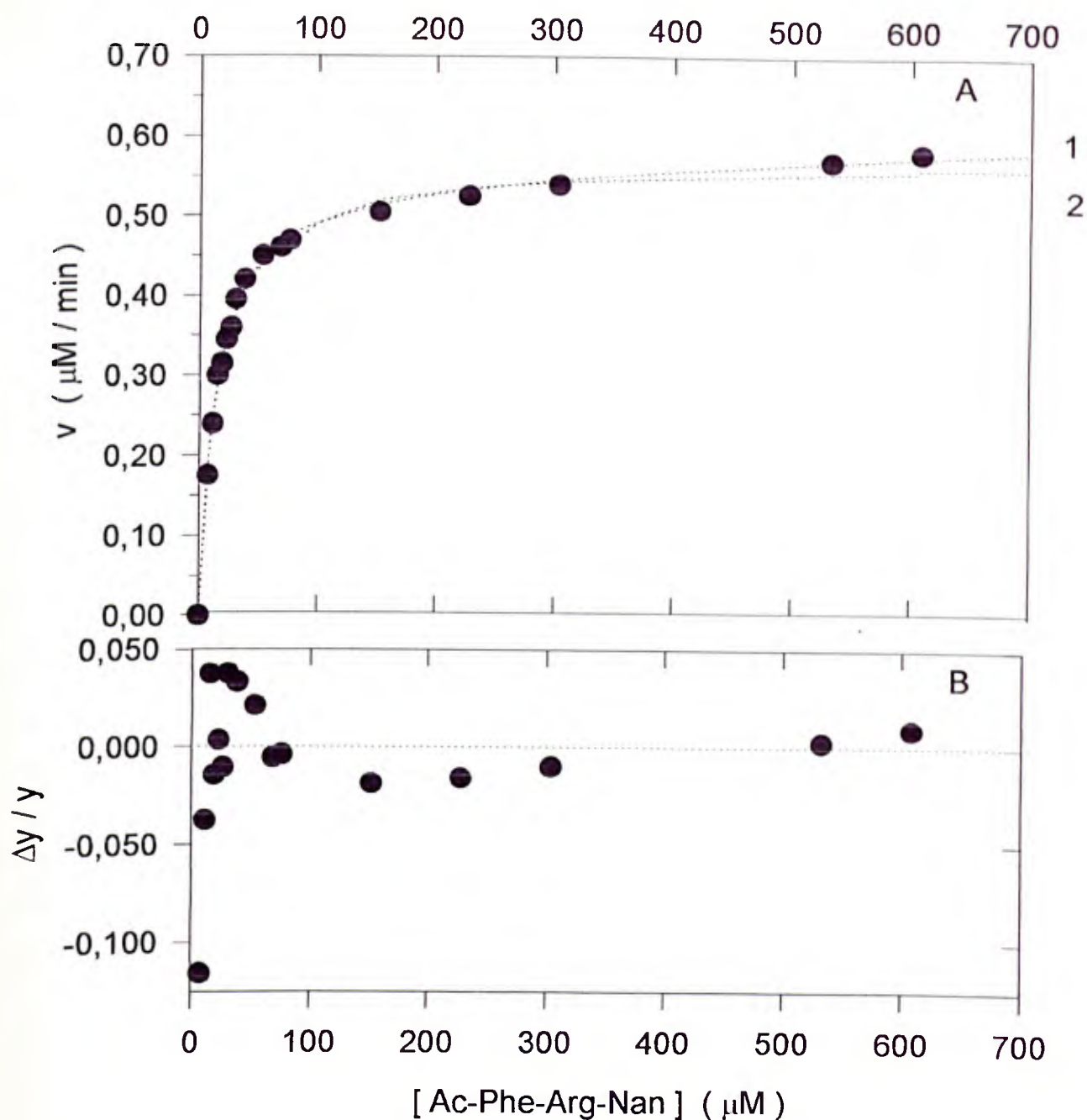
**FIGURA 14** - Determinação do efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana.

**Condições:** Experiência conduzida em tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0. Concentração molar real do substrato  $8,0 \times 10^{-6}$  M. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.2.2.



**FIGURA 15** - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana.

**Condições:** Experiência conduzida em tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0, 12 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . [calicreína = 3,2 nM] Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.2.3. .



**FIGURA 16** - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Ac-Phe-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana.

**Condições:** Experiência conduzida em tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0, 20 minutos a 37°C. [Calicreína = 5,3 nM]. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.2.3.

**TABELA 3** - Coeficientes da equação de velocidade obtidos por ajuste dos dados experimentais.

	D-Val-Leu-Arg-Nan	Ac-Phe-Arg-Nan
$\alpha$	$0,225 \pm 0,007$	$0,040 \pm 0,002$
$\beta$	$(4,590 \pm 0,980) \times 10^{-5}$	$(4,160 \pm 1,860) \times 10^{-6}$
$\gamma$	$0,084 \pm 0,004$	$0,072 \pm 0,004$

**TABELA 4** - Constantes cinéticas para as hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana.

Constantes Cinéticas	D-Val-Leu-Arg-Nan	Ac-Phe-Arg-Nan
$K_s = K_z$ ( $\mu\text{M}$ )	12,22	14,70
$k$ ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ )	2,75	0,58
$k_1$ ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ )	0,24	0,016
$K_z = K_{sz}$ ( $\mu\text{M}$ )	441	265
$k/k_1$	11,5	36,3
$K_z/K_s$	36,1	18,0

## II.6.2. Cinética da hidrólise dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe catalisada pela calicreína urinária humana

### III.6.2.1. Determinação dos coeficientes de extinção molar da benzoil-L-arginina (Bz-Arg) do Bz-Arg-OEt da tosil-L-arginina (Tos-Arg) e do Tos-Arg-OMe

Na Figura 17 está representada a reta obtida na determinação do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_M$ ), do Bz-Arg-OEt, em pH 3,5. O coeficiente de extinção molar, calculado como a inclinação da reta obtida e os outros coeficientes de extinção molar calculados de maneira análoga são apresentados na Tabela 5.

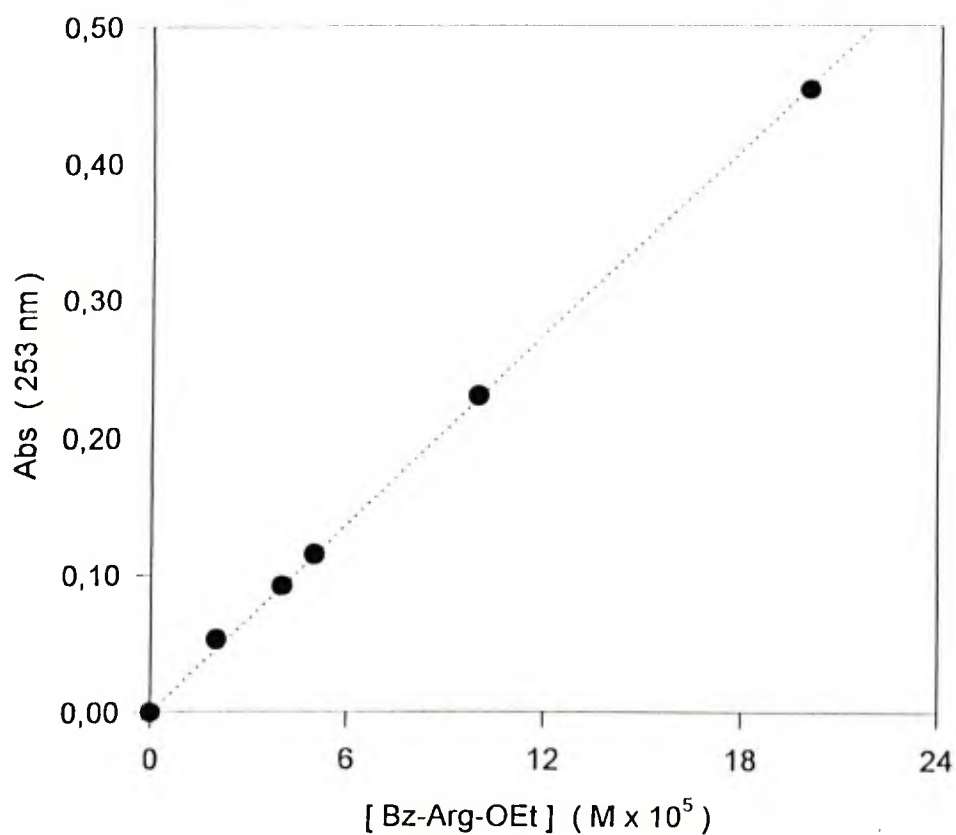
### III.6.2.2. Cinética da hidrólise do substrato Bz-Arg-OEt

O pH ótimo determinado conforme descrito no item II.5.3.2. para a hidrólise do Bz-Arg-OEt catalisada pela calicreína urinária humana foi 8,5.

A determinação do efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de hidrólise do Bz-Arg-OEt em pH 8,5 e 37°C mostrou que a hidrólise do substrato é linear até pelo menos 20 minutos. A concentração molar real do substrato utilizada para a realização desta experiência foi  $2,0 \times 10^{-4}$  M, sendo a menor concentração deste substrato utilizada na derminação de  $K_m$  e  $V_{max}$ .

Na Figura 18 está representado o gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-OEt catalisada pela calicreína urinária humana. A hidrólise deste substrato obedece à cinética de Michaelis-Menten até a concentração do substrato de 1,0 mM. Em concentrações superiores a esta observa-se uma progressiva diminuição nas velocidades de hidrólise do substrato, a qual estabiliza em 68% de inibição.

Os valores de  $K_s$  e  $V_{max}$  para a hidrólise do Bz-Arg-OEt catalisada pela calicreína urinária humana foram calculados admitindo-se que em baixas concentrações de substrato a enzima não sofre inibição pelo substrato. A maior concentração do substrato utilizada para o cálculo dos valores de  $K_s$  e  $V_{max}$  foi  $6,0 \times 10^{-4}$  M que, como pode ser observado na figura 18 aparentemente não inibe a enzima. Os valores de  $K_s$  e  $V_{max}$ , calculados conforme descrito no item II.5.6, foram, respectivamente,  $482 \pm 28,30 \mu\text{M}$  e  $17,69 \pm 0,58 \mu\text{M}.\text{min}^{-1}$ .



**FIGURA 17** - Determinação do coeficiente de extinção molar do substrato Bz-Arg-OEt.

**Condições:** Experiência conduzida em pH 3.5. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.3.3.1..

**TABELA 5** - Coeficientes de extinção molar ( $\epsilon_M$ ) para Bz-Arg-OEt, Bz-Arg, Tos-Arg-OMe e Tos-Arg em pH 3,5.

Reagente	$\epsilon_M$ ( $\mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
Bz-Arg-OEt	2.257 $\pm$ 19
Bz-Arg	3.043 $\pm$ 30
Tos-Arg-OMe	1.148 $\pm$ 55
Tos-Arg	2.253 $\pm$ 26

### III.6.2.3. Cinética da hidrólise do substrato Tos-Arg-OMe

O pH ótimo determinado conforme descrito no item II.5.3.2 para a hidrólise do Tos-Arg-OMe catalisada pela calicreína urinária humana foi 9,0.

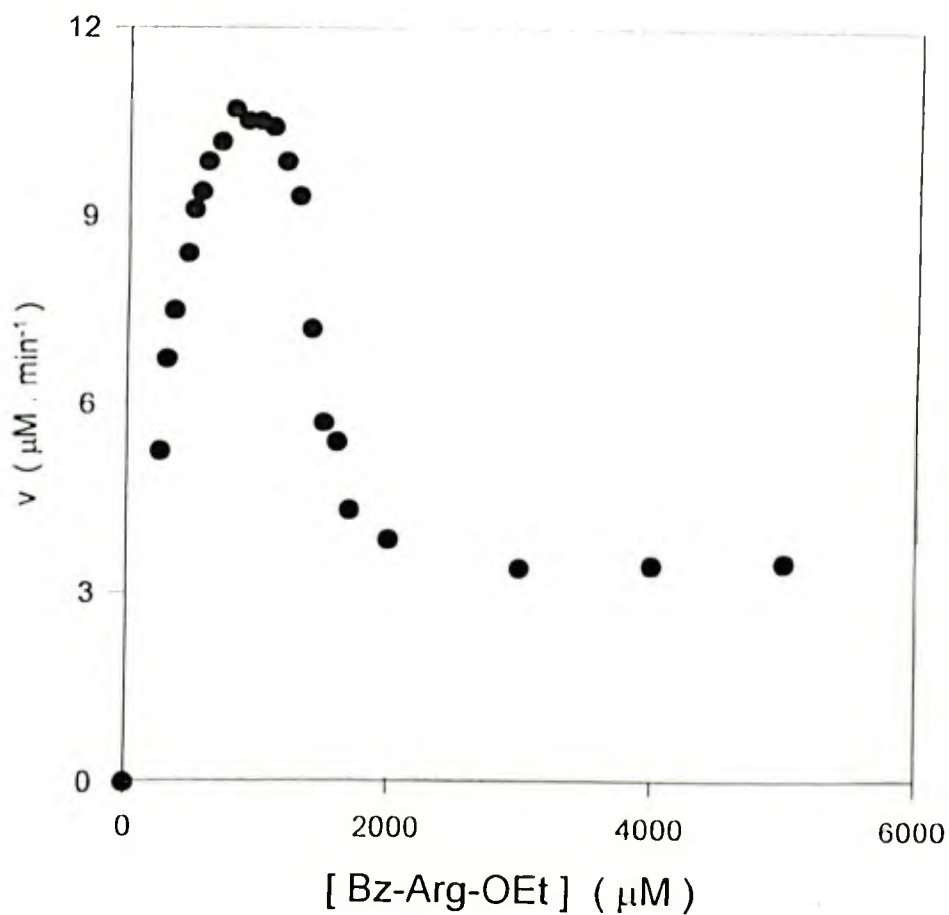
A determinação do efeito do tempo de incubação sobre a velocidade de hidrólise do substrato Tos-Arg-OMe catalisada pela calicreína urinária humana é linear até pelo menos 35 minutos. A concentração molar real do substrato utilizada para realização desta experiência foi  $2,5 \times 10^{-4}$  M, a menor concentração deste substrato utilizada na determinação de  $K_s$  e  $V_{max}$ .

Na Figura 19 está representado o gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Tos-Arg-OMe catalisada pela calicreína urinária humana. A hidrólise deste substrato obedece à cinética de Michaelis-Menten até a concentração do substrato de aproximadamente 1,0 mM. Em concentrações do substrato superiores a esta, observa-se uma progressiva diminuição nas velocidades de hidrólise do substrato, a qual estabiliza em 68% de inibição.

Os valores de  $K_s$  e  $V_{max}$  para a hidrólise do Tos-Arg-OMe pela calicreína urinária humana foram calculados admitindo-se que em baixas concentrações do substrato a enzima não sofre inibição pelo substrato. A maior concentração do substrato utilizada para o cálculo dos valores de  $K_s$  e  $V_{max}$  foi  $6,0 \times 10^{-4}$  M que, como pode ser observado na Figura 19 aparentemente não inibe a enzima. Os

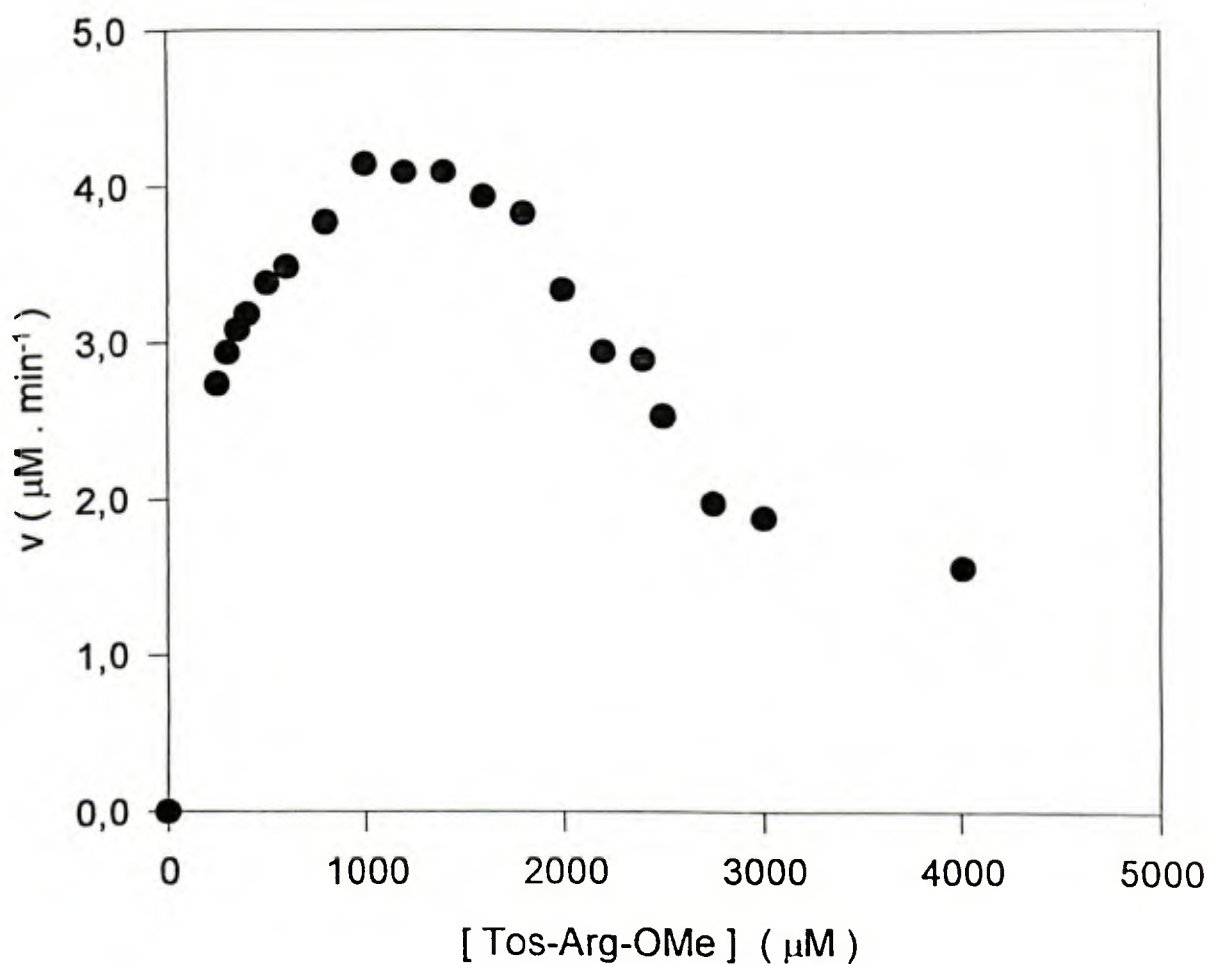
valores de  $K_s$  e  $V_{max}$ , calculados conforme descrito no item II.5.6 foram, respectivamente,  $145 \pm 5,03 \mu\text{M}$  e  $4,34 \pm 0,04 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A Tabela 6 resume os valores de  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/k_m$  para as hidrólises dos substratos Ac-Phe-Arg-Nan, D-Val-Leu-Arg-Nan, Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe catalisadas pela calicreína urinária humana.



**IGURA 18** - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-OEt catalisada pela calicreína urinária humana.

**Condições:** Experiência conduzida em tampão TRIS-HCl 0,2 M pH 8,5, 20 minutos de incubação a 37°C. [Calicreína = 6,4 nM]. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.3.4.



**FIGURA 19** - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Tos-Arg-OMe catalisada pela calicreína urinária humana.

**Condições** : Experiência conduzida em tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0, 20 minutos a 37°C. [Calicreína = 6,4 nM]. Para maiores detalhes vide Metodologia, item II.5.3.4.

**TABELA 6** - Parâmetros cinéticos para a hidrólise de substratos sintéticos catalisada pela calicreína urinária humana.

SUBSTRATO	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
Ac-Phe-Arg-Nan	14,70 $\pm$ 0,88	1,79 $\pm$ 0,03	122
D-Val-Leu-Arg-Nan	12,22 $\pm$ 0,01	14,17 $\pm$ 0,22	1160
Tos-Arg-OMe	145,00 $\pm$ 5,03	11,30 $\pm$ 0,10	78
Bz-Arg-OEt	482,00 $\pm$ 28,30	46,07 $\pm$ 1,51	96

### III.7. Estudos de inibição das atividades amidásica e esterásica da calicreína urinária humana

#### III.7.1. Efeitos do etanol e da benzoil-L-arginina sobre a atividade esterásica da calicreína urinária humana com o substrato Bz-Arg-OEt

A atividade esterásica da calicreína urinária humana com o Bz-Arg-OEt não foi modificada na presença de etanol e benzoil-L-arginina em concentrações equimoleculares.

#### III.7.2. Inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana

##### III.7.2.1. Inibição pela aprotinina da atividade amidásica da calicreína urinária humana com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan

Os valores de  $K_i$  aparente para os complexos calicreína-aprotinina em diferentes concentrações do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan são mostrados nos gráficos de versus [I] na Figura 13. A Tabela 7 resume os valores médios de  $K_i$  <sub>ap</sub>.

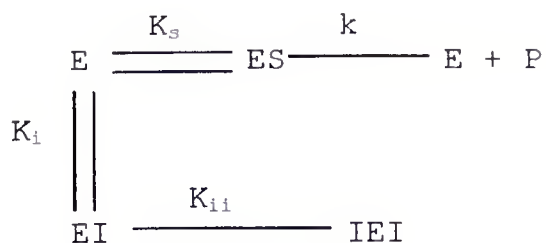
Construindo-se um gráfico de  $K_i$  <sub>ap</sub> versus concentração do substrato obtem-se uma reta, onde o intercepto com a ordenada fornece o valor da constante de dissociação ( $K_i$ ) do complexo enzima-inibidor quando a inibição é do tipo competitiva simples (DIXON, 1972).

Na Figura 20 é mostrado o gráfico de  $K_i$  ap em função da respectiva concentração do substrato. Como pode ser observado a reta obtida não fornece um valor positivo de  $K_i$  sugerindo uma inibição mais complexa do que a competitiva simples.

De acordo com PLOWMAN (1972) construindo-se um gráfico das inclinações das retas obtidas no gráfico dos duplos recíprocos versus a concentração do inibidor obtem-se curvas as quais dão uma indicação do tipo de inibição competitiva: reta (inibição competitiva linear), parábola (inibição competitiva parabólica) e hipérbole (inibição competitiva hiperbólica).

O gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan na ausência e na presença de cinco diferentes concentrações de aprotinina é mostrado na Figura 21. Como pode ser visto, as retas obtidas convergem para um único valor de  $1/V_{max}$  mostrando que a inibição da calicreína urinária humana por aprotinina é do tipo competitiva. Na Figura 22 está representado o gráfico das inclinações destas retas versus a concentração de aprotinina. Observa-se uma parábola, indicando assim que a inibição é do tipo competitiva parabólica.

Após ter-se idéia do mecanismo de inibição pelos métodos gráficos partiu-se para a proposição do modelo cinético de inibição:



Este esquema dá a seguinte equação para a velocidade inicial

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \frac{K_s \times [I]^2}{K_i \times K_{ii}}}$$

Os duplos recíprocos correspondentes a equação acima originam a seguinte equação:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s \left[1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[I]^2}{K_i \cdot K_{ii}}\right]}{V_{\max} [S]} \quad (1)$$

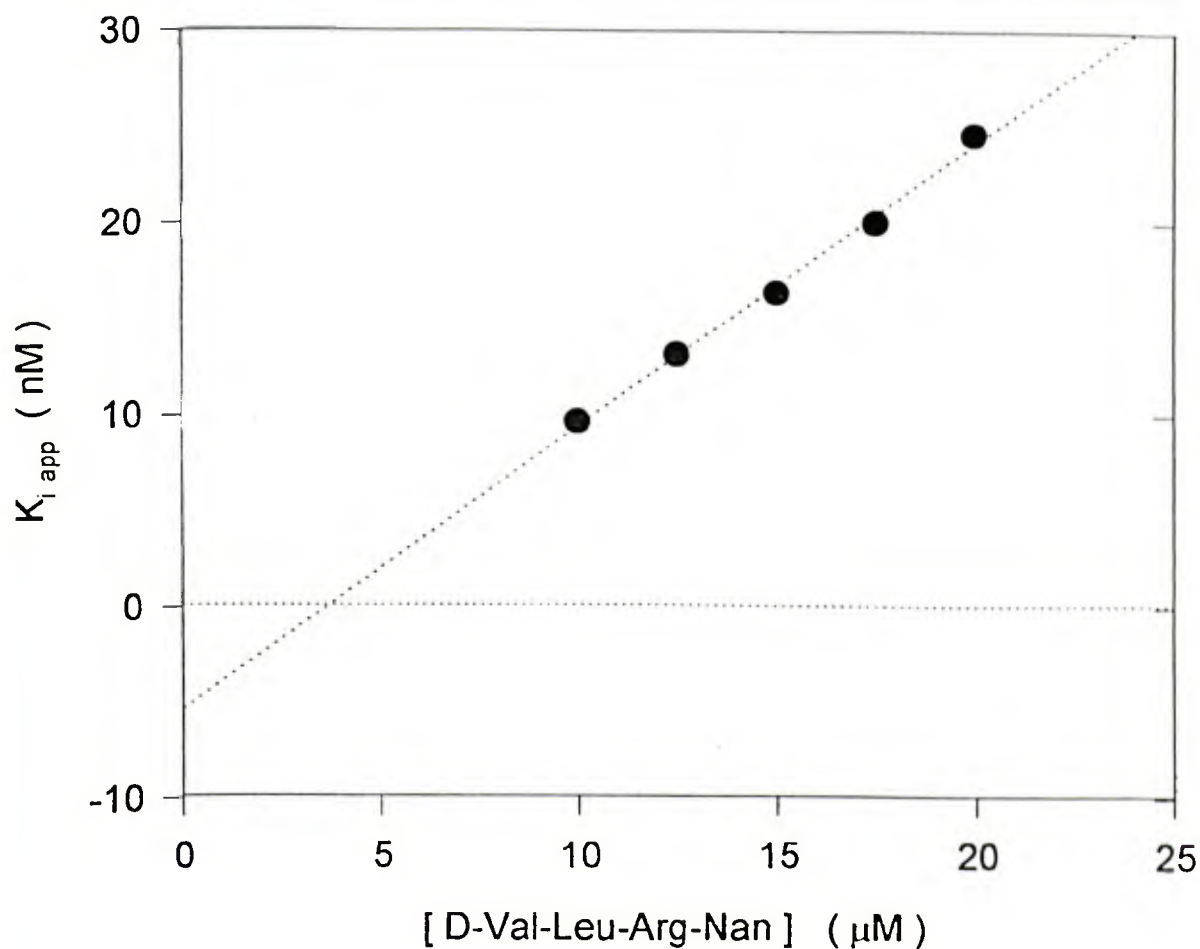
onde

$$\text{Inclinação} \times \left(\frac{V_{\max}}{K_s}\right) = 1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[I]^2}{K_i \times K_{ii}}$$

Através do conhecimento dos valores das inclinações das retas obtidas no gráfico dos duplos recíprocos e dos valores de  $K_s$  e  $V_{\max}$  foi possível determinar os valores de  $K_i$  e  $K_{ii}$  por ajuste dos dados experimentais pelo processo de regressão não linear, sendo iguais a 16,2 nM e 1,1 nM, respectivamente.

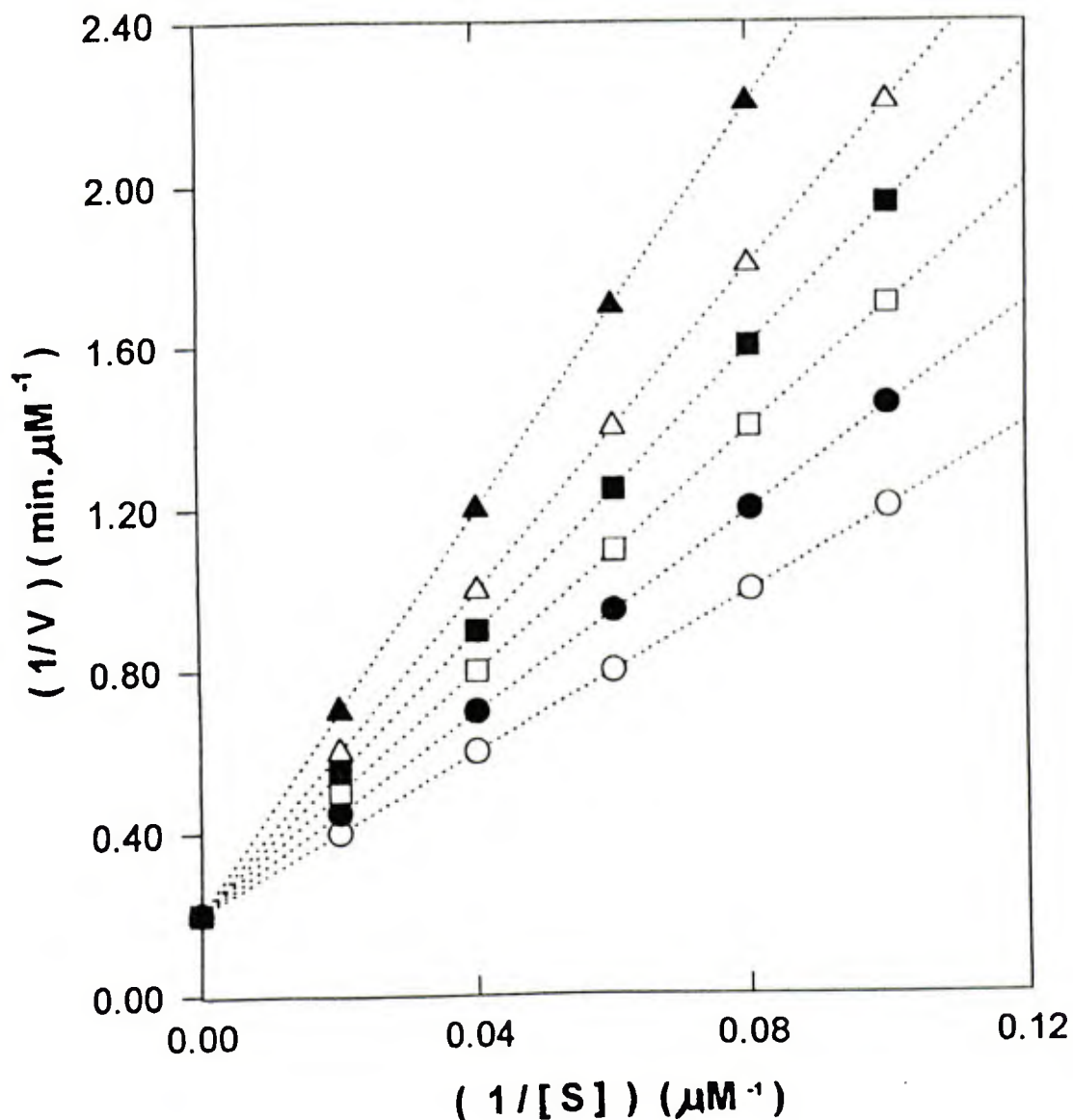
**TABELA 7** - Constantes de dissociação ( $K_{i \text{ app}}$ ) para os complexos aprotinina-callicreína urinária humana.

[D-Val-Leu-Arg-Nan] ( $\mu\text{M}$ )	$K_{i \text{ app}}$ (nM)
10,0	9,64
12,5	13,14
15,0	16,40
17,5	20,00
20,0	24,60



**FIGURA 20** - Gráfico de DIXON ( 1972) para a determinação da constante de dissociação ( $K_i$ ) do complexo calicreína-aprotinina.

Os valores de  $K_i$  aparente para cada concentração do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan foram estimados através dos gráficos da Figura 12 e são apresentados na Tabela 7.



**FIGURA 21** - Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana na ausência e presença de cinco concentrações de aprotinina.

**Condições:** As incubações eram realizadas em tampão glicin-NaOH, pH 9,0 a 37°C durante 5-10 min. Concentração da enzima: 4,0 nM. Concentração de aprotinina: (O) 0 nM; (●) 1,35 nM; (□) 2,70 nM; (■) 4,05 nM; (Δ) 5,40 nM e (▲) 9,15 nM. O intercepto (0,365 min/μM) corresponde a  $1/V_{\text{max}}$ .

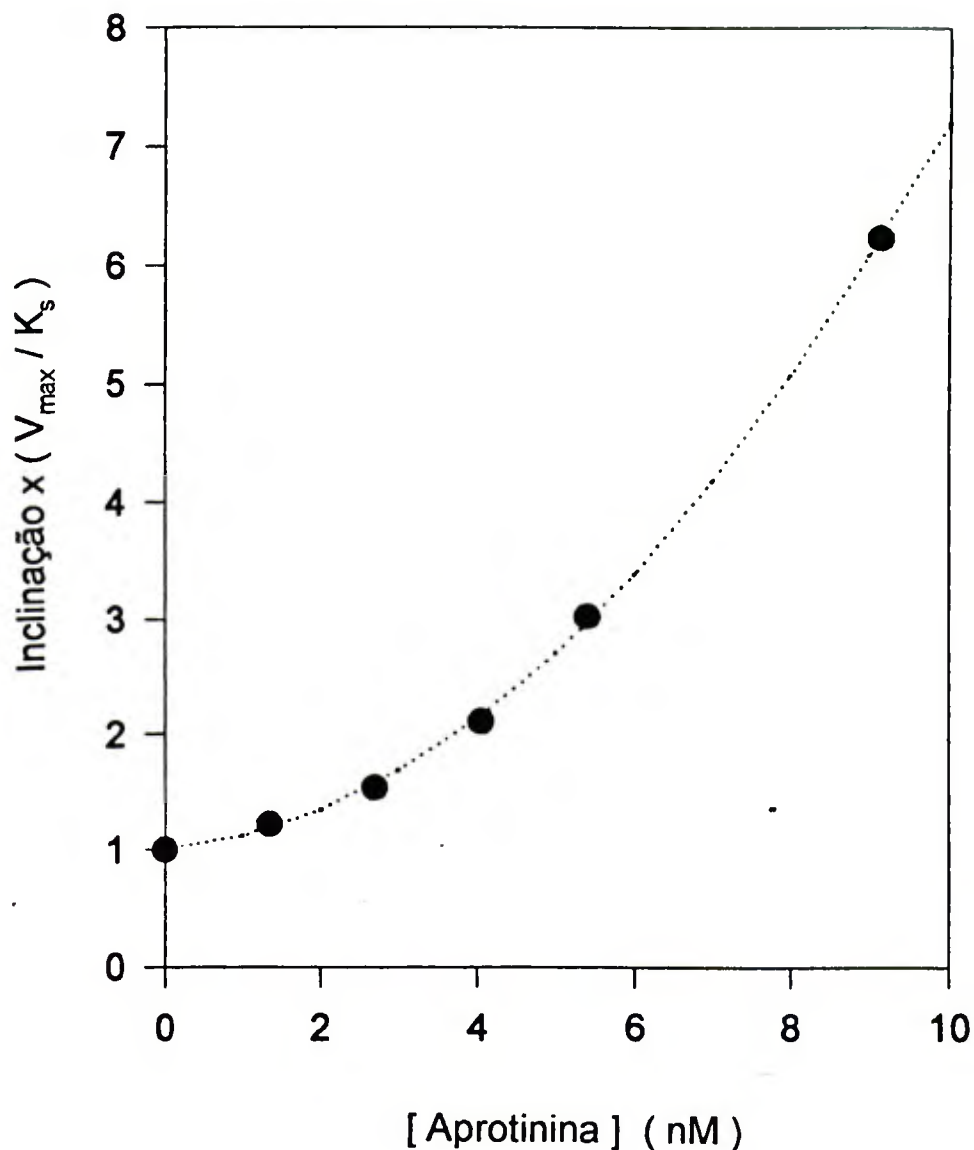


FIGURA 22 - Gráfico das inclinações  $x$  ( $V_{max}/K_s$ ) versus concentração de aprotinina.

**Condições:** O termo ( $V_{max}/K_s$ ) = 0,20  $\text{min}^{-1}$ . A curva foi construída através de ajuste dos dados experimentais à equação de velocidade apresentada no II.5.4.1. As constantes de inibição calculadas são:  $K_i = 16,2$  nM e  $K_{i1} = 1,10$  nM.

Os dados experimentais foram analisados também estatisticamente, de acordo com IZQUIERDO et al. (1987), onde a dependência da concentração de um ligante [X] pode ser expressa pela seguinte equação

$$v = \frac{\alpha_0 + \alpha_1[X] + \alpha_2[X]^2 + \dots + \alpha_n[X]^n}{E_0 \beta_0 + \beta_1[X] + \beta_2[X]^2 + \dots + \beta_n[X]^n}$$

sendo [X] a concentração de substrato ou inibidor. Os dados cinéticos de v ([I]) foram ajustados às equações com ordem crescente até que a soma dos quadrados dos resíduos fosse minimizada. Os seguintes modelos foram utilizados:

$$\text{modelo 1} \quad v = \frac{a_0}{E_0 b_0 + b_1[I]}$$

$$\text{modelo 2} \quad v = \frac{a_0 + a_1[I]}{E_0 b_0 + b_1[I]}$$

$$\text{modelo 3} \quad v = \frac{a_0}{E_0 b_0 + b_1[I] + b_2[I]^2}$$

$$\text{modelo 4} \quad v = \frac{a_0}{E_0 b_0 + b_1[I] + b_2[I]^2 + b_3[I]^3}$$

Para determinar a equação que melhor se ajusta aos dados experimentais foi utilizado o teste estatístico F a um

grau de confiabilidade de 95%, conforme descrito no ítem III.6.1.1.

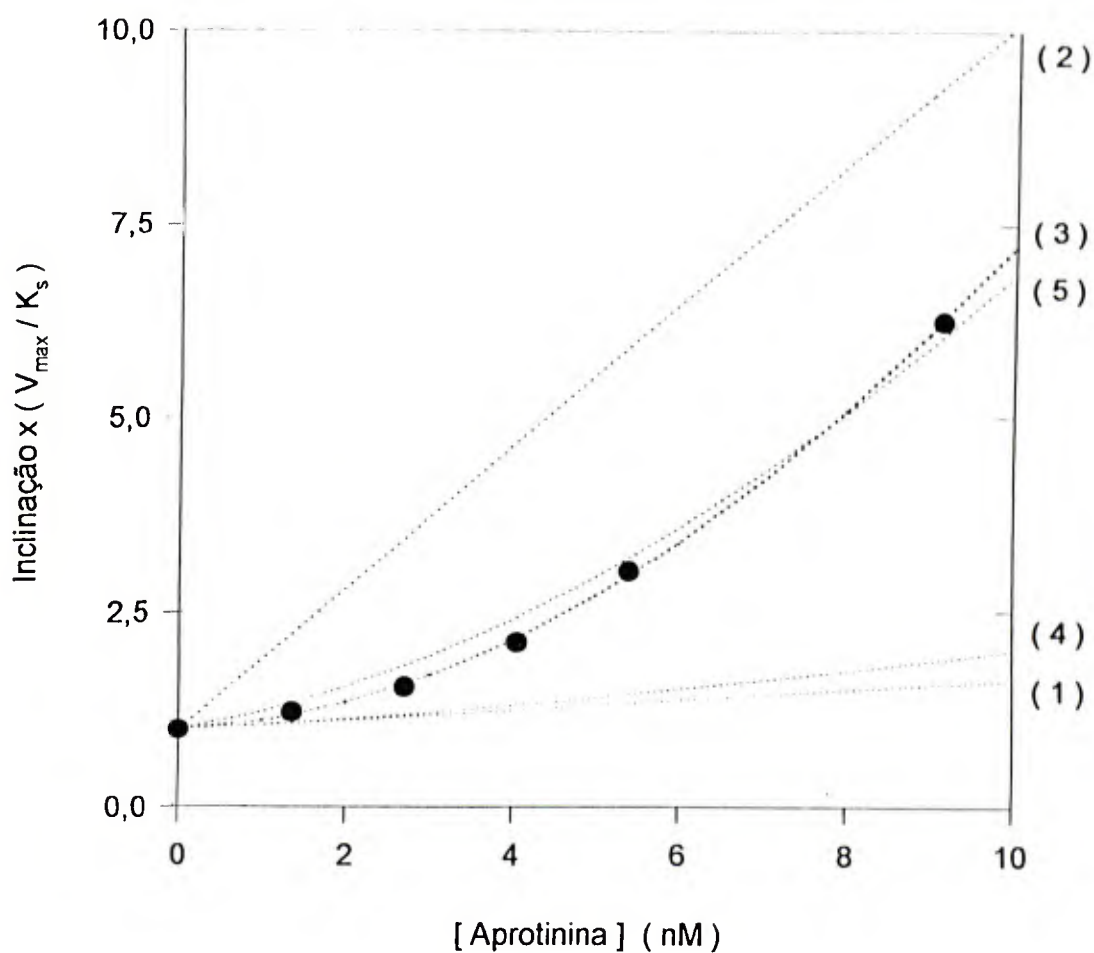
O estudo estatístico dos dados de  $v([I])$ , obtido para as diferentes concentrações de aprotinina, mostrou que a adição do termo dependente de  $[I]$  no numerador e de  $[I]^3$  no denominador não se justifica, pois apresentaram coeficientes negativos. Portanto, a escolha da equação que melhor se ajusta aos dados experimentais deveria ficar entre os modelos 1 e 3. Esta escolha foi feita usando o teste F, conforme já descrito, que indicou uma melhora extremamente significativa no ajuste dos dados experimentais ao modelo 3.

Outros valores de  $K_i$  e  $K_{ii}$  foram utilizados na busca de uma curva que apresentasse um melhor ajuste dos dados experimentais:

- 1)  $K_i = 16,2 \text{ nM}$  e  $K_{ii} = \infty$
- 2)  $K_i = 1,1 \text{ nM}$  e  $K_{ii} = \infty$
- 3)  $K_i = 16,2 \text{ nM}$  e  $K_{ii} = 1,1 \text{ nM}$
- 4)  $K_i = K_{ii} = 16,2 \text{ nM}$
- 5)  $K_i = K_{ii} = 5,08 \text{ nM}$

Como pode ser observado na Figura 23 os dados experimentais se ajustaram melhor para os valores de  $K_i$  e  $K_{ii}$  apresentados no ítem 3, onde se tem  $K_i = 16,2 \text{ nM}$  e  $K_{ii} = 1,1 \text{ nM}$ , cujos valores foram obtidos do ajuste dos dados experimentais à equação de velocidade descrita para a inibição competitiva parabólica, descrita por CLELAND (1963 e 1967).

Na Figura 24 está representada a curva de  $v$  versus [aprotinina] obtida para o ajuste dos dados experimentais à equação descrita para o modelo cinético. A concentração do substrato utilizada foi de  $17,5 \mu\text{M}$ . A parte B da figura apresenta o gráfico dos resíduos relativos. Como pode ser observado há uma distribuição aleatória dos resíduos indicando um bom ajuste dos dados experimentais à equação descrita para inibição competitiva parabólica. Nas outras concentrações do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan utilizadas ( $10$ ;  $12,5$ ;  $15$  e  $20 \mu\text{M}$ ) foram obtidos resultados semelhantes.



**FIGURA 23** - Gráfico dos ajustes das inclinações  $x (V_{\max}/K_s)$  versus concentração de aprotinina para vários valores de  $K_i$  e  $K_{ii}$ .

**Condições:**

- (1)  $K_i = 16,2$  nM e  $K_{ii} = \infty$
- (2)  $K_i = 1,1$  nM e  $K_{ii} = \infty$
- (3)  $K_i = 16,2$  nM e  $K_{ii} = 1,1$  nM
- (4)  $K_i = K_{ii} = 16,2$  nM
- (5)  $K_i = K_{ii} = 5,08$  nM

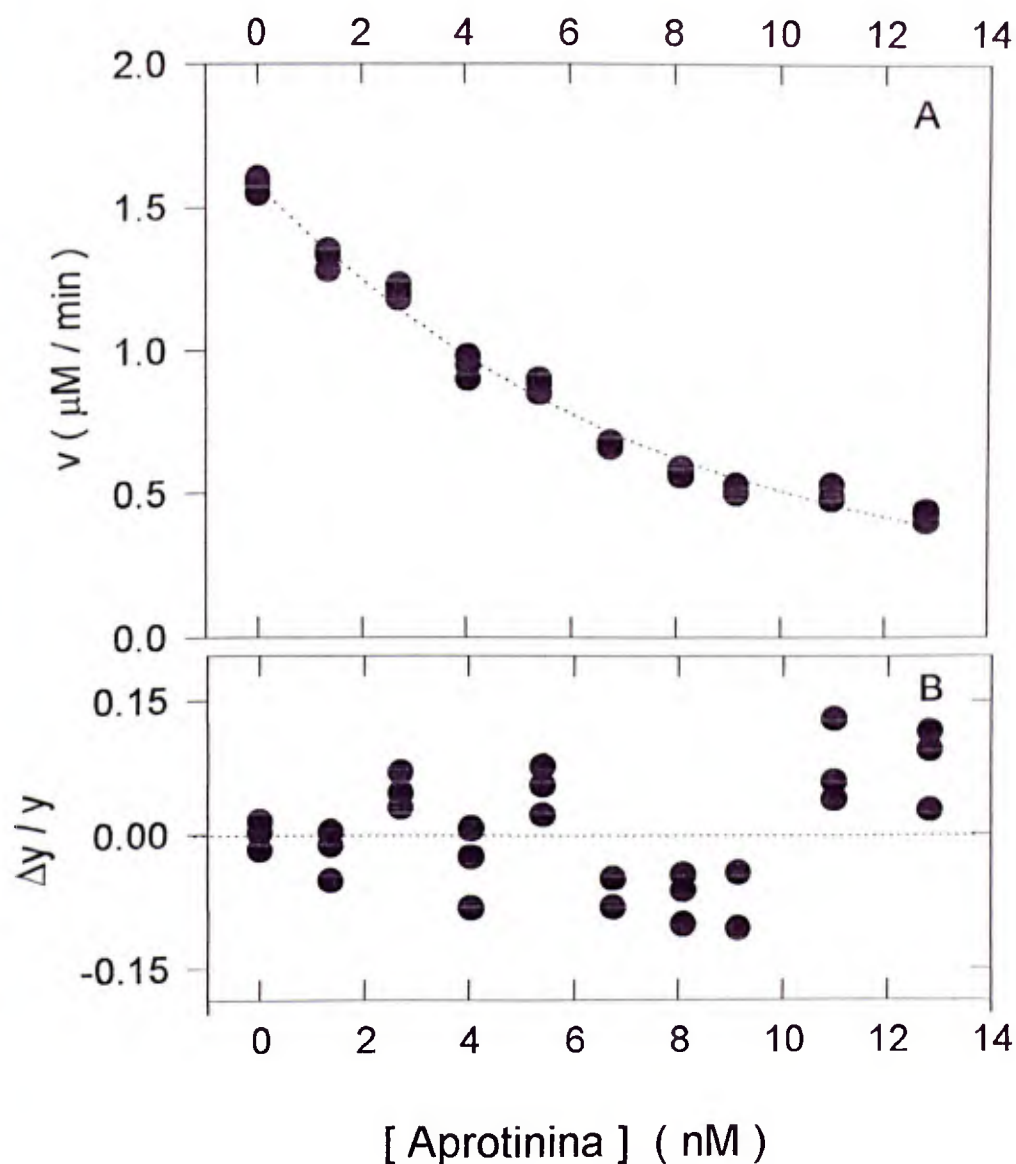


FIGURA 24 - A) Gráfico das velocidades residuais versus concentração de aprotinina.

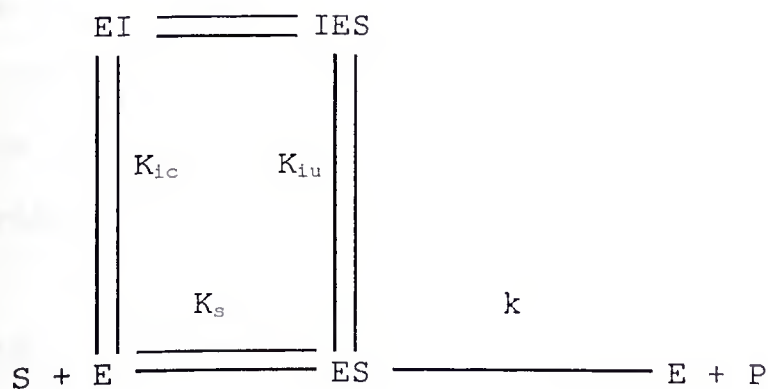
B) Gráfico dos resíduos

**Condições:** Experiência realizada em tampão glicina-NaOH, pH 9,0 a 37°C, durante 5-10 min, na ausência e presença de cinco concentrações de aprotinina. [D-Val-Leu-Arg-Nan] = 17,5  $\mu\text{M}$ , [calicreína] = 4,0 nM.

### III.7.2.2. Inibição pela benzamidina da atividade amidásica da calicreína urinária humana com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan

Na Figura 25 está representado o gráfico de Michaelis-Menten ( $v$  versus  $[S]$ ) para a hidrólise do D-Val-Leu-Arg-Nan na ausência e na presença de três concentrações de benzamidina. Como pode ser observado, tanto  $K_m$  como  $V_{max}$  sofreram variação indicando inibição do tipo mista. Os valores de  $K_{s(ap)}$  e  $V_{max(ap)}$  extraídos deste gráfico são apresentados na Tabela 8.

O modelo cinético que representa a inibição do tipo mista é descrito a seguir.



A equação de velocidade que representa o modelo de inibição é:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[K_s(1 + [I]/K_{ic}) + [S](1 + [I]/K_{iu})]}$$

As constantes de dissociação dos complexos enzima-inibidor ( $K_{ic}$  e  $K_{iu}$ ) foram determinadas por dois métodos diferentes:

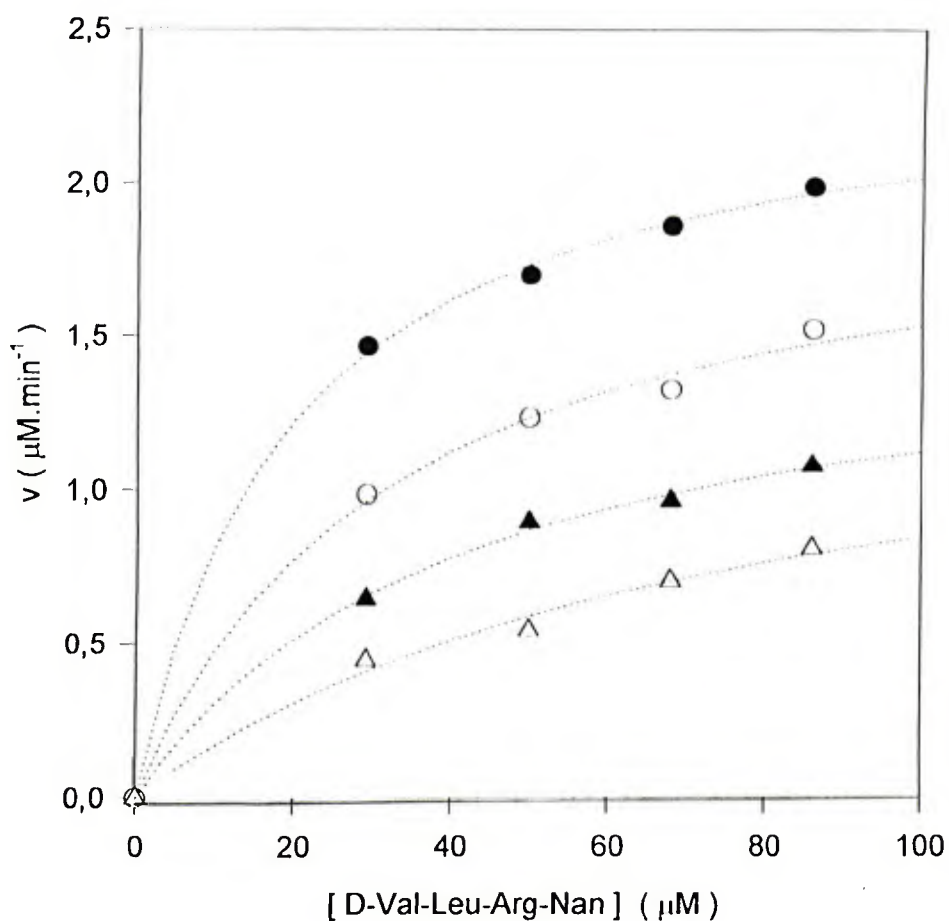
1) Pela análise simultânea dos dados experimentais à equação que decreve o modelo cinético de inibição. Para tanto fez-se uma regressão não linear utilizando-se o método dos mínimos quadrados de forma que os valores das constantes  $K_{ic} = 1,75 \pm 0,44$  mM e  $K_{iu} = 9,30 \pm 2,87$  mM foram obtidos pelo processo iterativo. Cada valor de velocidade utilizado na regressão representava a média das triplicatas obtidas nos experimentos.

2) Pelos métodos gráficos, onde eram construídos os gráficos de DIXON (1953) ( $1/v$  x  $[I]$ ) e de CORNISH-BOWDEN (1974) ( $[S]/v$  x  $[I]$ ). Os pontos de encontro no eixo das abcissas correspondentes ao intercepto das retas obtidas nos gráficos de  $1/v$  versus  $[I]$  e de  $[S]/v$  versus  $[I]$  fornecem, respectivamente, os valores de  $-K_{ic}$  e  $-K_{iu}$ .

O gráfico de  $1/v$  versus  $[I]$  apresentado na Figura 26 mostra que as retas convergem para um único ponto localizado no segundo quadrante, o que permitiu determinar o valor de  $K_{ic}$  (1,6 mM).

O gráfico de  $[S]/v$  versus  $[I]$  apresentado na Figura 27 mostra que as retas convergem para um único ponto, localizado no terceiro quadrante. O valor na abscissa correspondente a este ponto forneceu o valor de  $K_{iu}$  (9,8 mM).

Na Figura 28 é mostrado o gráfico de  $v$  versus  $[S]$  as curvas obtidas com os ajustes dos dados experimentais à equação de velocidade descrita para a inibição do tipo mista. A parte B da figura mostra o gráfico dos resíduos em função da concentração do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan que, como pode ser observado, há uma distribuição aleatória dos resíduos indicando um bom ajuste dos dados experimentais à equação.

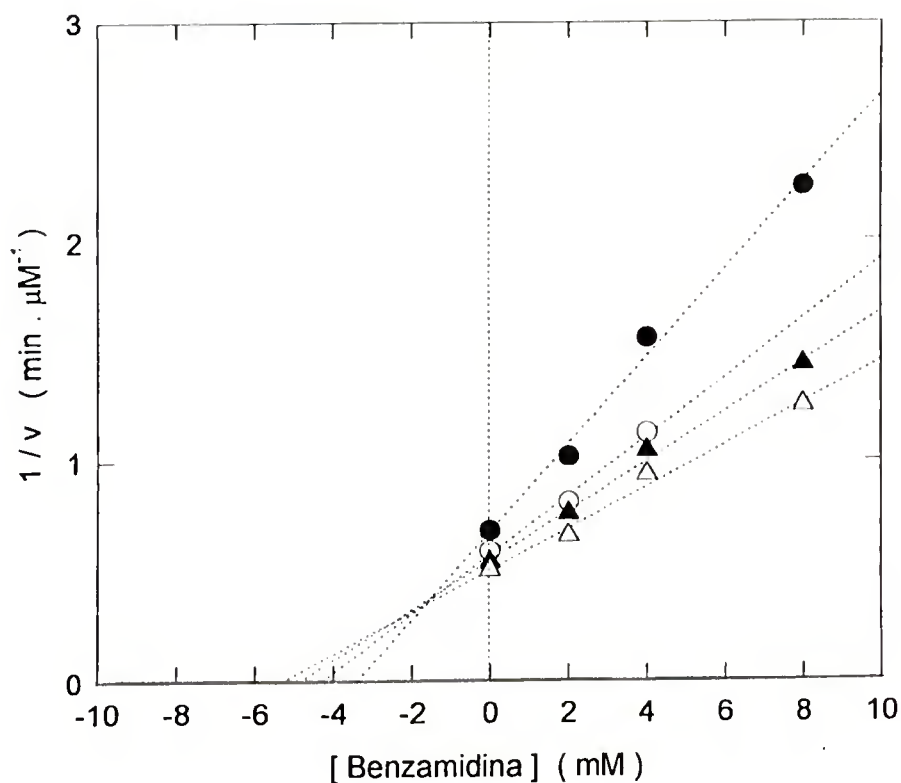


**FIGURA 25** - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela calicreína urinária humana na ausência e na presença de três concentrações de benzamidina.

**Condições:** As incubações eram feitas em tampão glicina-NaOH, pH 9,0 a 37°C, durante 7 min. [Calicreína] = 4,0 nM. Concentrações de benzamidina: (●) = 0; (○) = 2,0 mM; (▲) = 4,0 mM; (Δ) = 8,0 mM. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.5.2.

**TABELA 08** - Parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan (15-100  $\mu\text{M}$ ) catalisada pela calicreína urinária humana na presença de benzamidina.

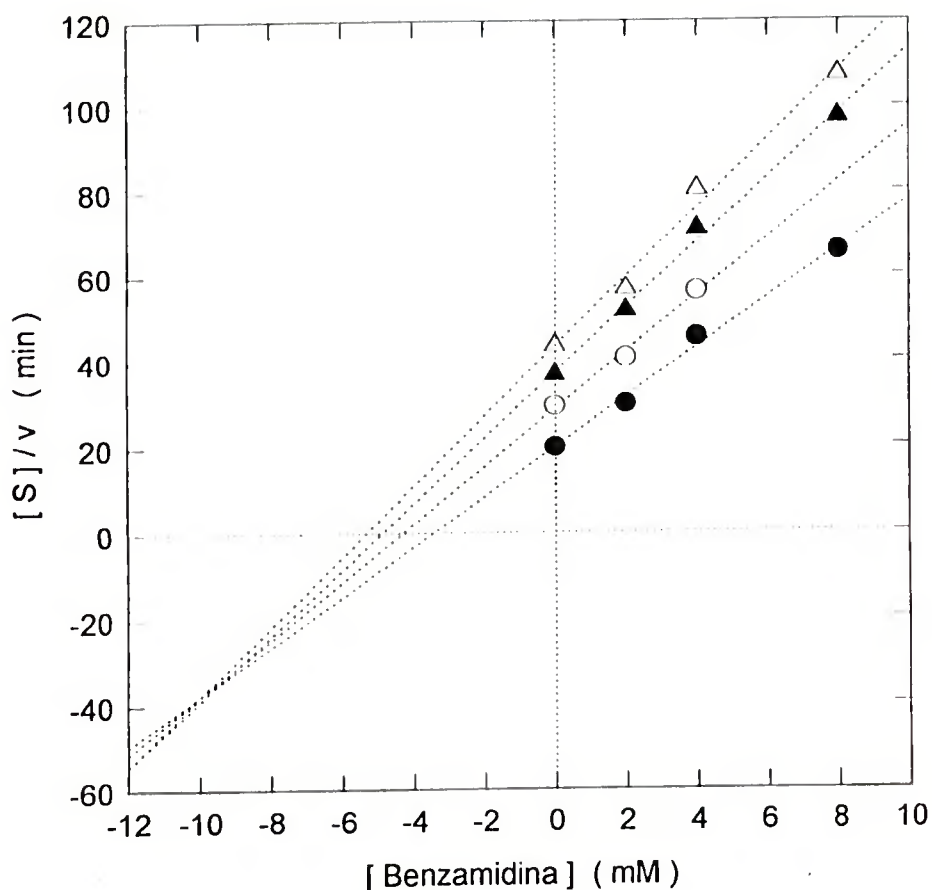
Benzamidina (mM)	$K_m$ ap ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ap ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ )
0	19,20 $\pm$ 2,00	2,40 $\pm$ 0,07
2,0	32,10 $\pm$ 6,30	2,02 $\pm$ 0,14
4,0	41,30 $\pm$ 5,50	1,58 $\pm$ 0,09
8,0	77,00 $\pm$ 27,00	1,49 $\pm$ 0,03



**FIGURA 26** - Gráfico de DIXON (1972) para determinação da constante de dissociação ( $K_{ic}$ ) do complexo calicreína urinária humana-benzamidina.

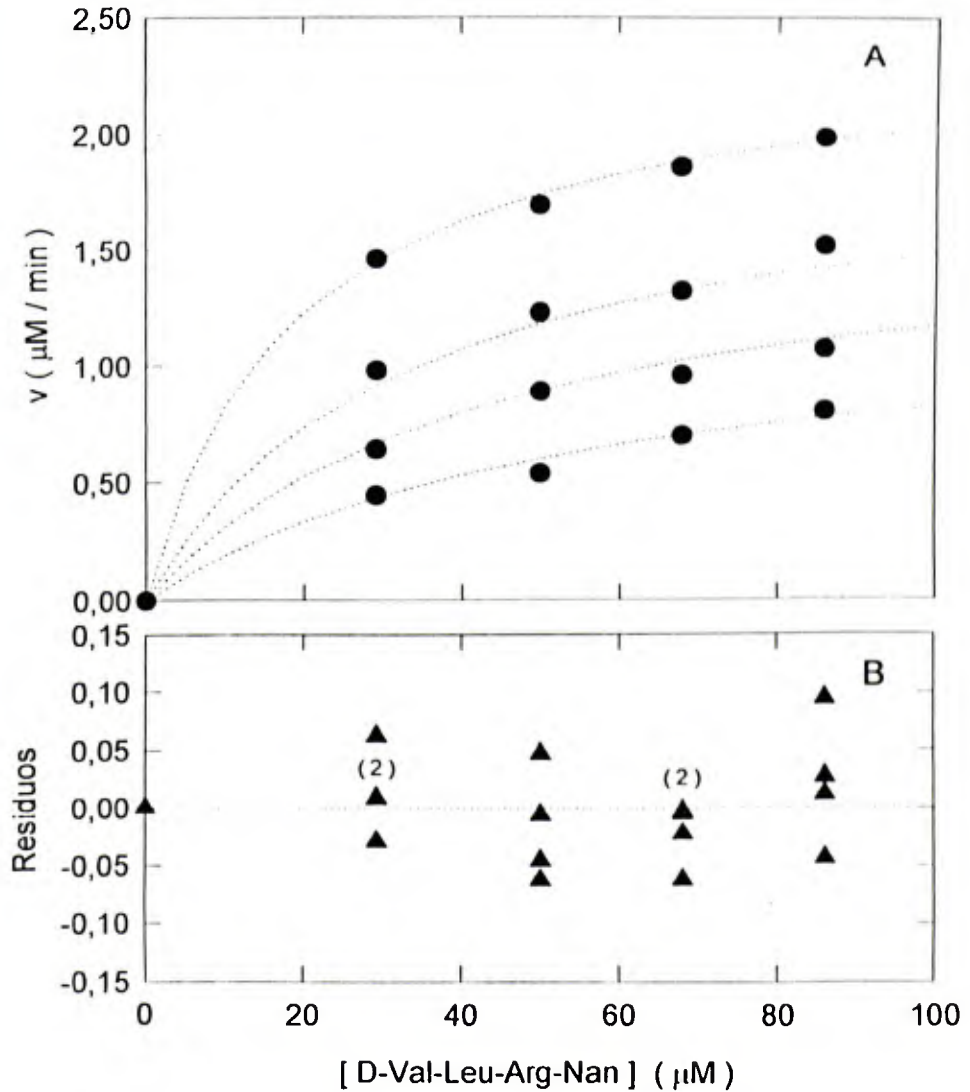
**Condições:** As incubações eram feitas em tampão glicina-NaOH, pH 9,0 a 37°C, durante 7 min. [Calicreína] = 4,0 nM. Concentrações do substrato: ( $\Delta$ ) = 86,1  $\mu$ M; ( $\blacktriangle$ ) = 68  $\mu$ M; ( $\circ$ ) = 50  $\mu$ M; ( $\bullet$ ) = 29,2  $\mu$ M. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.5.2.

(S) - D. val



**FIGURA 27** - Gráfico de CORNISH-BOWDEN (1981) para determinação da constante de dissociação ( $K_{iu}$ ) do complexo calicreína urinária humana-benzamidina.

**Condições:** As incubações eram feitas em tampão glicina-NaOH, pH 9,0 a 37°C, durante 7 min. [Calicreína] = 4,0 nM. Concentrações do substrato: (●) = 29,2  $\mu$ M; (○) = 50  $\mu$ M; (▲) = 68  $\mu$ M; (Δ) = 86,1  $\mu$ M. Para maiores detalhes vide Metodologia, ítem II.5.5.2.



**FIGURA 28** - A) Gráfico das velocidades residuais versus concentração de D-Val-Leu-Arg-Nan na ausência e na presença de três concentrações de benzamidina obtido por ajuste dos dados experimentais à equação de velocidade descrita para a inibição mista.

B) Gráfico dos resíduos versus concentração do D-Val-Leu-Arg-Nan.

## IV - DISCUSSÃO

### IV.1. Concentração da calicreína na urina humana

#### IV.1.1. Precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall

A precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall é um procedimento rápido e simples que se tornou uma etapa indispensável na obtenção de calicreína urinária humana pura, pois, desta forma, consegue-se retirar uma boa quantidade da proteína contaminante antes de dar início à concentração da urina com o gel poli(N-isopropilacrilamida).

A remoção desta glicoproteína otimiza o processo de concentração da calicreína com o gel poli(N-isopropilacrilamida) como demonstrado anteriormente (MIRANDA, 1990).

A glicoproteína de Tamm Horsfall apresenta ponto isoelétrico próximo de 8,0, enquanto que o ponto isoelétrico da calicreína urinária humana é de aproximadamente 4,0. Assim, no pH da urina (6,0) é provável que as duas proteínas estejam associadas, pois, estarão com cargas opostas dificultando assim, a separação da calicreína urinária humana. Portanto, acredita-se que a retirada desta glicoproteína tenha facilitado também a obtenção da calicreína urinária humana pura com apenas uma única etapa cromatográfica (cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina).

#### **IV.1.2. Concentração da calicreína na urina humana**

A utilização de um método adequado para a concentração da urina humana torna-se imprescindível na purificação da calicreína urinária humana, pois, a concentração da enzima na urina é muito baixa.

Os métodos convencionais de concentração da calicreína na urina descritos na literatura, tais como precipitação com sulfato de amônio, diálise e liofilização, ultrafiltração e adsorção em resinas são muito trabalhosos, caros e, em alguns casos, apresentam dificuldades operacionais e de escalonamento. A utilização do gel termosensível poli(N-isopropilacrilamida) para a concentração da urina humana substitui os métodos convencionais com expressiva vantagem.

Ao concentrar a calicreína na urina cerca de 20 vezes, reduz-se consideravelmente o volume de urina facilitando assim a sua diálise e liofilização. Partindo-se de 10 litros de urina humana chega-se ao final do processo de concentração a um volume de cerca de 500 ml, volume este, muito mais fácil de ser dialisado e liofilizado.

#### **IV.2. Purificação da calicreína urinária humana por afinidade**

A purificação propriamente dita da calicreína urinária humana era realizada através de uma única cromatografia em coluna de Sepharose-aprotinina, possibilitando uma purificação de 903 vezes com um rendimento

de 33%. O fator de purificação e o rendimento são considerados altos e o processo é bem mais simples que os processos de purificação da calicreína urinária humana, citados na literatura (Tabela 9).

Este novo processo proposto para a concentração e a purificação da calicreína urinária humana facilita a obtenção da enzima em grande escala.

MORICHI et al. (1984) apresentam um método para purificação da calicreína urinária humana em larga escala. Os autores descrevem a utilização de uma grande quantidade de sílica-gel para concentrar a calicreína na urina, seguida de mais cinco etapas cromatográficas para a purificação da enzima. Nesse método o rendimento é de 22,5% e o fator de purificação de 621,6 vezes. A sílica-gel utilizada praticamente se perde, uma vez que a sua regeneração é muito difícil. Assim, o processo é caro além de muito trabalhoso.

O método de purificação ora descrito, além de ser muito mais simples do que o descrito por MORICHI et al. (1984) apresenta outras vantagens tais como fator de purificação e rendimento bem maiores.

A atividade amidásica específica da calicreína urinária humana pura, usando-se o Ac-Phe-Arg-Nan como substrato, foi de 3,313 mM de p-Nan/(mg.min). Não há na literatura valores de atividades amidásicas específicas de calicreínas urinárias humanas com esse substrato que possam ser comparados com os valores encontrados neste trabalho.

### IV.3. Critérios de pureza e valores de pesos moleculares

A pureza da preparação de calicreína urinária humana foi comprovada por quatro processos diferentes: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptoetanol e cromatografias da calicreína urinária humana em coluna de Superose 12 HR 10/30 em equipamento FPLC, em coluna Poros (crosslinked polystyrene/divinylbenzene) em fase reversa e de troca iônica em coluna Poros II Q/P em equipamento HPLC.

Como pode ser observado na Figura 6 a calicreína urinária humana purificada mostrou uma única banda de proteínas, quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e após redução com 2-mercaptoetanol. Devido ao fato da calicreína ser uma glicoproteína as suas eletroforeses, em geral, apresentam bandas difusas, conforme a observada na figura.

O perfil da cromatografia da calicreína urinária humana purificada em coluna de Superose 12 HR 10/30 (Figura 7) mostrou um único pico, simétrico quanto à absorção em 280 nm e com atividade amidásica com o substrato Ac-Phe-Arg-Nan totalmente superposta a ele, demonstrando assim, a pureza da preparação enzimática.

Os perfis mostrados nas cromatografias da calicreína urinária humana em fase reversa e de troca iônica (Figuras 8 e 9, respectivamente) demonstram, novamente, a

pureza da preparação enzimática, uma vez que, em tais cromatografias observa-se um único pico de proteínas.

Os pesos moleculares aparentes estimados para a calicreína urinária humana foram de 31.000 determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e 2-mercaptoetanol (Figura 10) e de 45.000 determinado por cromatografia de exclusão molecular (Figura 11).

O peso molecular da calicreína urinária humana estimado por titulação direta com aprotinina foi de 25.000. Este valor é muito próximo do valor de peso molecular (25.500) citado por GEIGER et al. (1980) para a calicreína urinária humana, estimado a partir de sua composição em aminoácidos.

A faixa de pesos moleculares citada na literatura para a calicreína urinária humana é bastante ampla, variando, dependendo do processo utilizado para a sua determinação, de 23.000 a 64.000 (Tabela 9). Como pode ser observado os pesos moleculares aqui descritos para a calicreína urinária humana estão dentro da faixa citada na literatura.

Uma vez constatada a pureza da preparação de calicreína urinária humana pela eletroforese e cromatografias de gel filtração, troca iônica e de fase reversa e a sua identidade com a calicreína urinária humana descrita por GEIGER & FRITZ (1981), indicada pelas concordâncias do peso molecular estimado por filtração em gel e pela titulação com aprotinina, do ponto isoelétrico, de sua inibição por aprotinina e benzamidina e por não ser inibida pelo inibidor

de tripsina extraído de soja (SBTI), mesmo em uma concentração molar 12400 vezes maior do que a da calicreína, decidiu-se passar à sua caracterização cinética.

**Tabela 9** - Processos de purificação e pesos moleculares citados na literatura para calicreína urinária humana.

Autores	Processos de purificação	Processos de determinação de pesos molecul.	Pesos moleculares
HIAL et al. (1974)	Sephadex G-25 e liofilização DEAE-Sephadex A-50 Sephadex G-150 Sephadex G-150	filtração em gel	43.000
GEIGER et al. (1977)	Diálise e liofilização Sephadex G-100 Sephacryl S-200	eletroforese-SDS filtração em gel	45.000 64.000
OLE-MOIYOI et al. (1977)	Ultracentrifugação DEAE-celulose DEAE-celulose Sephadex G-100	filtração em gel	27.000 a 43.000
OZA & RYAN (1978)	Precipitação com sulfato de amônio DEAE-celulose Sephacryl S-200	filtração em gel	45.000
GEIGER et al. (1981)	Diálise e liofilização Sephacryl S-200 Sephacryl S-200 DEAE-Sephacryl	titulação do centro ativo composição em aminoácidos	25.500 25.000
MORICHI et al. (1984)	Sílica gel Sephadex G-75 DEAE-Sephadex A-50 Bentonita Sephacryl S-200 Gel TSK G-3000 SWG	eletroforese-SDS filtração em gel	50.000 50.000
LIMA et al. (1986)	Diálise e liofilização Fracionamento com Sulfato de amônio DEAE-celulose Hidroxiapatita Sephacryl S-200	filtração em gel	23.000 27.000 25.100
MIRANDA (1990)	Concentração via gel termosensível Diálise e liofilização Sephacryl S-200 Hidroxiapatita	eletroforese-SDS	31.000

#### IV.4. Caracterização cinética da calicreína urinária humana

##### IV.4.1. Parâmetros cinéticos com substratos sintéticos

Nos estudos cinéticos utilizaram-se dois substratos do tipo peptidil p-nitroanilida e dois substratos do tipo éster que mimetizam seqüências próximas a uma das ligações peptídicas hidrolizadas no substrato natural pelas calicreínas.

Os valores de pH ótimo de 9,0 para as hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Arg-Nan, Ac-Phe-Arg-Nan, Tos-Arg-OMe e de 8,5 para a hidrólise do Bz-Arg-OEt catalisadas pela calicreína urinária humana estão dentro da faixa de pH ótimo para várias calicreínas tissulares, como descrito para a calicreína urinária de rato (SILVA et al, 1974), para a calicreína urinária humana (GEIGER & FRITZ, 1981), para a calicreína urinária de cavalo (GIUSTI et al, 1988) e calicreínas de glândulas submandibulares de rato (MATSUDA et al, 1976, PENA, 1990, CHAGAS, 1992 e SOUSA, 1993).

A análise das Figuras 15 e 16 mostra que as hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-Nan, catalisadas pela calicreína urinária humana não seguem o comportamento cinético descrito por Michaelis-Menten em toda a faixa de concentração dos substratos utilizada, pois observa-se uma ligeira ativação da enzima em concentrações mais elevadas dos substratos.

O modelo cinético proposto para as hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana é apresentado no item III.6.1.1. A equação de velocidade desenvolvida para esse modelo é uma razão de polinomiais de grau 2 tanto no numerador como no denominador. Entretanto, pela análise estatística dos dados experimentais constatou-se que a equação de velocidade que apresentou um melhor ajuste é uma razão de polinomiais tendo grau 2 no numerador e grau 1 no denominador (p. 84). Desse ajuste foram calculados os valores dos coeficientes da equação de velocidade apresentados na Tabela 3 e, conhecendo-se  $K_s$  e assumindo-se que  $K_{z1} = K_{z2}$  e  $K_z = K_{gz}$  foi possível determinar todas as constantes cinéticas mostradas na Tabela 4.

Como pode ser observado na Tabela 4 os valores das relações  $K_z/K_s$  iguais a 36,1 e 18,0 para as hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-Nan, respectivamente, catalisadas pela calicreína urinária humana são altos mostrando que a afinidade do sítio ativo da enzima por estes substratos é muito maior do que a afinidade do segundo sítio pelos mesmos substratos.

As razões  $k/k_1$  (constante de velocidade para a quebra do complexo ES do sítio ativo/ constante de velocidade para a quebra do complexo SES do sítio ativador) (p. 81) para os substratos D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-Nan são 11,5 e 36,3, respectivamente. Esses valores mostram que a ativação

da calicreína urinária humana por excesso dos substratos é pequena.

A equação de velocidade desenvolvida para o modelo cinético proposto é representada em termos de  $v/e_0$ . Como os ajustes dos dados experimentais foram feitos utilizando-se valores de velocidade (e não  $v/e_0$ ) as constantes cinéticas  $k$  e  $k_1$  da equação não são as constantes catalíticas, mas sim, constantes de velocidade.

Na parte B das Figuras 15 e 16 são mostrados os gráficos dos resíduos relativos para o melhor ajuste dos dados experimentais. Como pode ser observado há uma distribuição aleatória dos resíduos indicando um bom ajuste dos dados à equação de velocidade que contém um termo quadrático para a concentração do substrato no numerador.

No trabalho de GEIGER et al. (1980) não há nenhuma referência sobre a ativação da calicreína urinária humana por excesso do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan. Não há na literatura dados relativos ao comportamento cinético da calicreína urinária humana com o substrato Ac-Phe-Arg-Nan. Entretanto, OLIVEIRA et al. (1987) mostraram que a calicreína pancreática de porco é ativada por substratos do tipo 4-nitroanilida, dentre os quais encontram-se o D-Val-Leu-Arg-Nan e o Ac-Phe-Arg-Nan. GIUSTI et al. (1988) afirmaram que a calicreína urinária de cavalo, segue à cinética descrita por Michaelis-Menten e, segundo SOUSA (1993) a calicreína submandibular de rato é inibida em altas concentrações dos substratos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan.

Para explicar a ativação da calicreína pancreática de porco por altas concentrações dos substratos do tipo 4-nitroanilida OLIVEIRA et al. (1987) propõem a existência de um sítio auxiliar na enzima, ao qual poderia ligar-se uma segunda molécula de substrato que funcionaria como um modulador alostérico positivo, conforme o modelo proposto para a ativação da tripsina por TROWBRIDGE et al. (1963).

O modelo cinético desenvolvido neste trabalho para as hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Arg-Nan e Ac-Phe-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana também propõe a existência de um sítio auxiliar para a ligação de uma segunda molécula de substrato.

As hidrólises dos substratos Bz-Arg-OEt (Figura 18/) e Tos-Arg-OMe (Figura 19) catalisadas pela calicreína urinária humana apresentaram um comportamento bimodal. A enzima obedece à cinética de Michaelis-Menten em baixas concentrações dos substratos, porém, em concentrações mais elevadas observa-se uma progressiva diminuição nas velocidades de hidrólise caracterizando a inibição da calicreína urinária humana por excesso de substrato.

Esta observação está de acordo com os resultados publicados por FIEDLER & WERLE (1968) para as hidrólises do Bz-Arg-OEt e do Tos-Arg-OMe catalisadas pela calicreína pancreática de porco, OLE-MOI YOI et al. (1977) para as hidrólises de Tos-Arg-OMe e Bz-Arg-OMe catalisadas pela calicreína urinária humana e AMOURIC & FIGARELLA (1980) para a hidrólise do Bz-Arg-OEt catalisada pela calicreína

pancreática humana, para as hidrólises dos substratos Bz-Arg-OEt (RODRIGUES, 1993) e Tos-Arg-OMe (SOUSA, 1993) catalisadas pela calicreína submandibular de rato. Entretanto, GIUSTI et al. (1988) afirmaram que as hidrólises do Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe catalisadas pela calicreína urinária de cavalo, segue à cinética descrita por Michaelis-Menten em toda a faixa de concentração dos substratos utilizada. Por outro lado, SILVA et al. (1974) afirmaram que a calicreína urinária de rato é ativada em altas concentrações do substrato Tos-Arg-OMe.

A inibição da calicreína urinária humana em altas concentrações de Tos-Arg-OMe descrita aqui está em desacordo com os resultados publicados por HIAL et al. (1974) para a hidrólise do mesmo substrato catalisada pela calicreína urinária humana, que afirmaram que a enzima sofre ativação em concentrações do substrato maiores do que 2,0 mM.

Os valores de  $K_m$  calculados para as hidrólises dos substratos Bz-Arg-OEt, Tos-Arg-OMe e D-Val-Leu-Arg-Nan catalisadas pela calicreína urinária humana são menores do que os citados na literatura (Tabela 10). Entretanto, comparando-se os valores de  $V_{max}$  observa-se que com os substratos do tipo éster os valores são maiores do que os citados por HIAL et al. (1974) e GEIGER et al. (1977) e menor do que o valor publicado por OLE MOI-YOI et al. (1979). Com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan o valor calculado foi menor do que o valor citado por GEIGER et al. (1980). As diferenças

observadas nos valores de  $K_s$  e  $V_{max}$  devem ser devidas a pequenas diferenças nas condições experimentais utilizadas.

Analizando-se a Tabela 6 verifica-se que para os substratos do tipo 4-nitroanilida os valores de  $K_s$  são muito próximos. Entretanto, os valores de  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_s$  ( $14,17 \pm 0,22$  e  $1.160$ , respectivamente) para o D-Val-Leu-Arg-Nan são 8,0 e 9,5 vezes maiores do que os valores obtidos para o Ac-Phe-Arg-Nan ( $k_{cat} = 1,79 \pm$  e  $k_{cat}/K_s = 122$ ), respectivamente, mostrando assim, que o D-Val-Leu-Arg-Nan é melhor substrato para a calicreína urinária humana do que o Ac-Phe-Arg-Nan.

Estes resultados estão de acordo com os resultados de OLIVEIRA et al. (1987) que, analisados, mostram que entre os substratos Ac-Phe-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan para a calicreína pancreática de porco, o D-Val-Leu-Arg-Nan é melhor substrato. Entretanto, para a calicreína urinária de cavalo, segundo ARAÚJO-VIEL et al. (1988) os parâmetros cinéticos calculados para os dois substratos revelam que a especificidade da enzima por eles é praticamente a mesma.

Os parâmetros cinéticos calculados para as hidrólises dos substratos do tipo éster, apresentados na Tabela 6, mostram que a calicreína urinária humana apresenta uma maior afinidade pelo Tos-Arg-OMe, porém a eficiência catalítica e a especificidade são maiores para o Bz-Arg-OEt. Estes resultados estão de acordo com os de FIEDLER & WERLE (1968) para a hidrólise dos substratos do tipo éster

catalisada pela calicreína pancreática de porco e com ARAÚJO-VIEL et al. (1988) para a calicreína urinária de cavalo.

Nenhuma comparação foi feita entre os parâmetros cinéticos ( $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_m$ ) para os substratos do tipo éster com os substratos do tipo 4-nitroanilida, pois a etapa limitante da velocidade de reação, em geral, é diferente para os dois tipos de substrato.

**TABELA 10** - Comparação de algumas constantes cinéticas para a hidrólise de substratos sintéticos pela calicreína urinária humana.

Substrato	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ )	Ref.
Bz-Arg-OEt	1340	0,34	HIAL et al. (1974)
	560	—	MATSUDA et al. (1976)
	380	—	"
	480	—	"
	1100	7,14	GEIGER et al. (1977)
	482	20,10	Este trabalho
Tos-Arg-OMe	1140	0,37	HIAL et al. (1974)
	750	—	MATSUDA et al. (1976)
	490	—	"
	330	—	"
	670	1,90	GEIGER et al. (1977)
	400	194,00	OLE MOI-YOI et al. (1979)
	145	4,93	Este trabalho
D-Val-Leu-Arg-Nan	24	5,67	GEIGER et al. (1980)
	11,9	3,10	Este trabalho

\*As condições experimentais utilizadas pelos diferentes autores são ligeiramente diferentes.

#### IV.5. Inibição das atividades amidásica e esterásica da calicreína urinária humana

##### IV.5.1. Inibição da atividade esterásica da calicreína urinária humana pelo excesso dos substratos

As inibições da calicreína urinária humana em altas concentrações dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe, mostradas nas Figuras 18 e 19 revelam uma inibição progressiva em função do aumento das concentrações dos substratos até 68% de inibição, quando as inibições se estabilizam.

O fenômeno de inibição da calicreína urinária humana em altas concentrações dos substratos não pode ser atribuído à perda de atividade da enzima, uma vez que ela mostrou-se estável nas condições em que foram conduzidos os ensaios, mantendo 100% de sua atividade enzimática após 60 min de incubação a 37°C. O tempo máximo de incubação da calicreína urinária humana com os substratos era de 20 min.

Uma segunda hipótese para explicar a diminuição nas velocidades de hidrólise em altas concentrações dos substratos seria a possibilidade de inibição da calicreína urinária humana pelos produtos da reação. Entretanto, a atividade esterásica da enzima com o substrato Bz-Arg-OEt não foi afetada na presença de etanol e Bz-Arg em concentrações equimoleculares, sugerindo assim, que o efeito inibitório não é devido aos produtos formados na reação.

Os dados obtidos neste trabalho para a inibição da calicreína urinária humana por excesso dos substratos Bz-Arg-OEt e Tos-Arg-OMe foram submetidos ao tratamento cinético proposto por DIXON & WEBB (1958), para inibição enzimática por excesso de substrato.

Segundo estes autores, a inibição de enzimas com vários subsítios de ligação, por excesso de substrato, ocorre como consequência da formação de complexos improdutivos enzima-substrato. Nestes complexos improdutivos, alguns dos grupos ligantes da enzima estão combinados com parte de uma molécula de substrato, enquanto outros estão interagindo com partes de uma outra molécula de substrato formando um complexo improdutivo  $ES_2$ . A probabilidade de formação destes complexos aumentaria em altas concentrações do substrato.

Os dados obtidos neste trabalho não se ajustaram a este modelo.

Torna-se importante também, a realização de estudos cinéticos da calicreína urinária humana com o substrato natural, o cininogênio, explorando uma ampla faixa de concentrações do substrato, visando obter um melhor conhecimento do comportamento cinético da enzima com seu substrato natural.

#### IV.5.2. Inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana

##### IV.2.1. Inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana por aprotinina

A inibição da calicreína urinária humana por aprotinina foi amplamente estudada. Dos gráficos de velocidade residual versus concentração de aprotinina em cada concentração do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan foram extraídos os valores de  $K_1$  aparente (Tabela 7). O gráfico de  $K_1$  aparente versus concentração do substrato originou uma reta, mas com intercepto negativo nos eixos das ordenadas, indicando que o mecanismo de inibição da calicreína urinária humana pela aprotinina era mais complexo que o competitivo citado por GEIGER et al. (1977).

O gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 21) indicou uma possível inibição competitiva da enzima pela aprotinina. Entretanto, segundo PLOWMAN (1972), a inibição competitiva pode ser linear, parabólica ou hiperbólica. Segundo o autor para se distinguir os vários tipos de inibição competitiva faz-se o gráfico das inclinações das linhas obtidas no gráfico dos duplos-recíprocos versus concentração do inibidor. O resultado (reta, parábola ou hipérbole) indica o tipo de inibição competitiva. De acordo com PLOWMAN (1972) se simplesmente o termo competitivo é usado, o tipo linear de inibição competitiva está sendo assumido.

O gráfico das inclinações das retas obtidas nos duplos recíprocos versus a concentração de aprotinina é mostrado na Figura 22. A parábola obtida indica que a inibição é do tipo competitiva parabólica.

Estes resultados são consistentes com o modelo cinético proposto em que calicreína e aprotinina podem formar um complexo ternário, onde uma molécula de calicreína liga-se a duas de aprotinina. Somente em concentrações muito baixas do inibidor (abaixo de 4,0 nM) calicreína e aprotinina formam um complexo equimolecular (Figura 22). Nestas condições, a aprotinina pode ser usada para titular a calicreína.

Parece pouco provável que ambas as moléculas de aprotinina estejam ligadas ao sítio ativo da calicreína, pois além do tamanho das moléculas de aprotinina (PM = 6511) somente um subsítio aniônico S<sub>1</sub> (nomenclatura de SHECHTER & BERGER, 1967) tem sido descrito no sítio ativo da molécula de calicreína, ao qual se liga a Lys 15 da molécula de aprotinina.

Foi mostrado no presente trabalho que a estequiometria da reação entre calicreína urinária humana e aprotinina depende da concentração do inibidor (MIRANDA et al., 1995). Isto explica a controvérsia na literatura sobre a inibição de calicreínas por aprotinina. VOGEL & WERLE (1970) reportaram que a inibição de calicreína por aprotinina é não competitiva, enquanto GEIGER et al. (1977) reportaram que a inibição da calicreína urinária humana por aprotinina é

competitiva. Entretanto, esses investigadores não publicaram os gráficos de seus dados experimentais.

O valor de  $K_i$  para a aprotinina (9 nM) citado por GEIGER et al. (1980) e GEIGER & FRITZ (1981) é diferente do valor de  $K_i$  (16,20 nM) calculado no presente trabalho. Esta diferença pode ser devida ao fato de terem sido determinados por métodos diferentes.

De nossos dados experimentais foi possível calcular os valores de  $K_i$  (16,20 nM) e  $K_{ii}$  (1,10 nM).

Outros valores de  $K_i$  e  $K_{ii}$  foram utilizados na tentativa de se obter um melhor ajuste dos dados experimentais. Fazendo-se  $K_i = 16,2$  nM e  $K_{ii} = \infty$ ;  $K_i = 1,1$  nM e  $K_{ii} = \infty$  ou  $K_i = K_{ii} = 16,2$  nM foram obtidas retas por ajuste dos dados à equação de velocidade (Figura 23). Já na simulação (5) onde se fez  $K_i = K_{ii} = 5,08$  foi obtida uma curva que se aproximou do comportamento descrito, entretanto, um melhor ajuste foi alcançado para os valores de  $K_i = 16,2$  nM e  $K_{ii} = 1,1$  nM.

Como pode ser observado  $K_{ii} < K_i$ , isto é, a segunda molécula de aprotinina liga-se à enzima com uma maior afinidade que a primeira sugerindo que este segundo sítio de ligação provavelmente tenha sido criado ou positivamente modulado pela ligação da primeira molécula de aprotinina ao centro ativo da enzima.

A presença de um segundo sítio de ligação para substrato na tripsina, isto é, um sítio de ativação, tem sido

sugerido por várias linhas de evidências. A formação de complexos binários e ternários entre tripsina, substrato e um modificador, o qual pode ser o próprio substrato, com decomposição dos complexos ternários a uma velocidade maior que os complexos binários foi descrita por TROWBRIDGE et al. (1963) e TSUNEMATSU et al. (1983). OLIVEIRA et al. (1993) mostraram que o sítio secundário está diretamente relacionado com o mecanismo de ativação da tripsina. Estudos cinéticos de inibição da tripsina por aprotinina mostraram que a enzima e este inibidor formam um complexo equimolecular (GREEN & WORK, 1953) e KASSEL (1970).

Estudos cinéticos da inibição de calicreína pancreática de porco pela aprotinina mostraram que a enzima e o inibidor também formam um complexo equimolecular (DIETL et al., 1979). A estrutura do complexo calicreína pancreática de porco-aprotinina foi determinada por estudos de difração de raios X em cristais obtidos de uma mistura equimolecular da enzima e do inibidor. Entretanto, JUNQUEIRA et al. (1992) demonstraram que o DABB é um inibidor competitivo parabólico das calicreínas A e B de pâncreas de porco.

Três considerações nos levam a crer que o sítio de ligação para a segunda molécula de aprotinina na molécula de calicreína seja diferente do sítio secundário ( $S_2'$ ) descrito para a tripsina: a) a estequiometria é 2:1, enquanto que para a tripsina é 1:1; b) a tripsina é ativada quando a molécula do modificador se liga ao subsítio  $S_2'$ , enquanto que a ligação da segunda molécula de aprotinina à calicreína

aumenta a inibição e c) devido ao tamanho da molécula de aprotinina parece pouco provável que duas moléculas de inibidor possam ligar aos subsítios  $S_1$  e  $S_2'$  do centro ativo da calicreína simultaneamente.

Nós não conhecemos a posição deste novo sítio de ligação, mas acreditamos que ele não esteja muito próximo do sítio ativo da calicreína. A caracterização mais detalhada do segundo sítio de ligação na calicreína urinária humana requer estudos de difração de raios X na estrutura cristalográfica do complexo ternário calicreína-aprotinina (1:2).

#### **IV.5.2.2. Inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana por benzamidina**

O gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan na ausência e na presença de três concentrações de benzamidina é mostrado na Figura 25. Como pode ser observado a inibição não é do tipo competitiva conforme foi descrito por HIAL et al. (1974) e GEIGER et al. (1977), pois à medida que a concentração de benzamidina aumenta o  $V_{max}$  diminui e o  $K_m$  aumenta. Esses valores são apresentados na Tabela 8.

A alteração tanto nos valores de  $K_m$  como nos valores de  $V_{max}$  para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan na presença de benzamidina sugere que a inibição é do tipo mista, com duas moléculas do inibidor ligando-se em dois sítios em uma única molécula de calicreína.

Os dados experimentais foram ajustados à equação de velocidade descrita para a inibição mista (item III.7.2.2). Por meio de ajuste, feito por regressão simultânea não linear, foi possível determinar os valores de  $K_{ic}$  e  $K_{iu}$  ( $1,75 \pm 0,44$  mM e  $9,30 \pm 2,87$  mM, respectivamente). A Figura 28 apresenta o ajuste dos dados experimentais à equação de velocidade descrita para a inibição mista. A parte B da Figura (gráfico dos resíduos relativos) mostra um bom ajuste, pois os resíduos relativos estão distribuídos de forma aleatória.

Os valores de  $K_{ic}$  e  $K_{iu}$  foram estimados também graficamente pelos gráficos de DIXON (1953) (Figura 26) e CORNISH-BOWDEN (1974) (Figura 27) sendo iguais a 1,60 mM e 9,83 mM, respectivamente. Como pode ser observado os métodos gráficos permitem estimar os valores das constantes de dissociação do complexo calicreína-benzamidina com uma boa aproximação.

O valor de  $K_{ic}$  aqui descrito está de acordo com o valor reportado por HIAL et al. (1974) de 2,0 mM para a constante de dissociação do complexo calicreína-benzamidina. Conforme já mencionado estes autores propõem que a inibição da calicreína urinária humana pela benzamidina é do tipo competitiva.

A tripsina, segundo MARES-GUIA & SHAW (1965) é inibida competitivamente pela benzamidina. A constante de dissociação do complexo tripsina-benzamidina reportada por esses autores é de 0,016 mM. Como pode ser observado este

valor é aproximadamente 100 vezes menor do que o  $K_{ic}$  obtido para o complexo benzamidina-caliceína urinária humana. Assim, benzamidina é melhor inibidor para a tripsina do que para a caliceína urinária humana, como demonstrado por MARES-GUIA & DINIZ (1967) para a caliceína urinária de rato.

Segundo GEIGER & MISKA (1988) os papéis fisiológicos e patofisiológicos das caliceínas tissulares no organismo ainda não estão claramente compreendidos e, segundo estes autores, há crescentes evidências de que as caliceínas tissulares podem ter um importante papel na regulação da pressão e do fluxo sanguíneo, na hipertensão, na função e disfunção renais, na proliferação celular, na motilidade e migração do esperma, na absorção intestinal e no metabolismo muscular da glicose ou no diabetes. Entretanto, para compreender melhor a participação das caliceínas tissulares nestes processos, acreditamos que é necessário uma melhor compreensão das propriedades enzimáticas destas caliceínas, e o presente trabalho é o resultado de um grande esforço desenvolvido com este objetivo.

## V - CONCLUSÕES

- 1 - O método de purificação da calicreína urinária humana apresentado mostrou uma significativa simplificação operacional em relação aos métodos de purificação descritos na literatura, tornando mais fácil a purificação da enzima em larga escala.
- 2 - A caracterização cinética com substratos sintéticos derivados da arginina  $N\alpha$ -substituída amida e éster mostrou que a calicreína urinária humana apresenta comportamento cinético bimodal:
  - a) em baixas concentrações dos substratos a enzima segue a cinética clássica de Michaelis-Menten.
  - b) Em altas concentrações dos substratos a enzima desvia-se da cinética de Michaelis-Menten, sendo levemente ativada pelos substratos do tipo 4-nitroanilida ( $k$  é 11,5 vezes maior que  $k_1$  com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan e 36,3 vezes maior com o substrato Ac-Phe-Arg-Nan) e, sensivelmente inibida pelos substratos do tipo éster (68%).
- 3 - A análise dos parâmetros cinéticos  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_m$ , para as hidrólises dos substratos sintéticos catalisadas pela calicreína urinária humana mostrou que dentre os dois substratos do tipo peptidil 4-nitroanilida testados o melhor foi o D-Val-Leu-Arg-Nan e dentre os dois substratos do tipo éster o melhor foi o Bz-Arg-OEt.

- 4 - A inibição da atividade esterásica da calicreína urinária humana observada em altas concentrações dos substratos do tipo éster não foi devida aos produtos da reação, nem à perda da atividade enzimática da calicreína urinária humana.
- 5 - A caracterização cinética da calicreína urinária humana com inibidores mostrou que:
- a) com a benzamidina, a inibição da atividade amidásica da enzima é do tipo mista, sugerindo que o inibidor pode ligar-se em dois diferentes sítios na molécula de calicreína.
  - b) Com a aprotinina, a inibição da atividade amidásica da calicreína urinária humana é do tipo competitiva parabólica, com duas moléculas de inibidor ligando-se a uma molécula de calicreína.

## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOURIC, M., FIGARELLA, C. Some properties of human pancreatic kallikrein and comparison with human trypsins and porcine kallikrein. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, v.361, p. 85-90, 1980.

ARAÚJO-VIEL, M.S, JULIANO, L., PRADO, E. S. The cleavage of the Met-Lys bond in a bradykinin derivative by glandular kallikreins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, v. 362, p. 337-345, 1981.

ARAÚJO-VIEL, M.S., JULIANO, M.A., OLIVEIRA, L. et al. Horse urinary kallikrein II. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler's*, v.369, p. 397-401, 1988.

BECKMANN, J., MEHLICH, A., SCHRÖDER, W. ET AL. Preparation of chemically "mutated" aprotinin homologues by semisynthesis. P1 substitutions change inhibitory specificity. *Eur. J. Biochem.*, v. 176, p. 675-682, 1988.

BERG, T. Immunochemical viewing of kallicrein in tissue In: SABATO, G.D. (Ed.). *Chemotaxis and inflammation: part M.*

New York: Academic Press, 1988. Cap. 13, p. 143-160.  
(Methods in Enzymology, 163).

BEYER, W. H. **Standard mathematical tables**. CRC Press, Inc.  
Boca Raton

BHOOLA, K.D., MAY MAY YI, R., MORLEY, J., et al. Release of  
kinin by an enzyme in the accessory sex glands of the  
guinea pig. **J. Physiol.** (London), v. 163, p. 269-280,  
1962.

BODE, W., CHEN, Z., BARTELS, K. Refined 2 A X-ray crystal  
structure of porcine pancreatic kallikrein A, a specific  
trypsin-like serine proteinase. **J. Mol. Biol.**, v. 164, p.  
237-282, 1983.

BOTHWELL, M. A., WILSON, W. H., SHOOTER, E. M. The  
relationship between glandular kallikrein and growth  
factor-processing proteases of mouse submaxillary gland. **J.**  
**Biol. Chem.**, v. 254, n. 15, p. 7287-7294, 1979.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the  
quantification of microgram quantities of proteins  
utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal.**  
**Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWNLEE, K. A. **Statistical theory and methodology in science and engineering**, Willey, New York, 433 p., 1960.

CHAGAS, J. R., HIRATA, I. Y., JULIANO, M. A. et al. Substrate specificities of tissue kallikrein and T-kininogenase: their possible role in kininogen processing. **Biochemistry**, v. 31, p. 4969-4974, 1992.

CHASE, T., SHAW, E. P-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCL: a new active site titration for trypsin. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 4, p. 508-514, 1967.

CORNISH-BOWDEN. **Biochem. J.**, v. 137, p. 143-144. 1974

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of enzyme kinetics**. 2a ed, Butterworths, 1981, p. 73-95.

DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. **Biochem. J.**, v. 55, p. 170-171, 1953

DIXON, M. The graphical determination of  $K_m$  and  $K_i$ . **Biochem. J.**, v. 129, p. 197-202, 1972.

DIXON, M., WEBB, E. C. Enzyme kinetics. IN: DIXON, M., WEBB, E. C. **Enzyme**, London: Longmans, 1958. 782 p., p. 62-181.

ELLIOT, D. F., LEWIS, G. P. Methionyl-lysyl-bradikinin, a new kinin from ox blood. In: ERDOS, G. E., WILDE, A. F. **Handbook of Experimental Pharmacology: XXV.** Berlin: Springer-Verlag, 1970. 768 p., p. 522-524.

ERLANGER, B. F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 95, p. 271-278, 1961.

FIEDLER, F. Enzymology of glandular kallikreins. In: ERDOS, G. E., WILDE, A. F. **Handbook of Experimental Pharmacology: XXV** Berlin: Springer-Verlag, 1970. 768 p., p. 103-161.

FIEDLER, F. WERLE, E. Activation, inhibition, and pH-dependence of the hydrolysis of a N-benzoyl-L-arginine ethyl ester catalysed by kallikrein from porcine pancreas. **Eur. J. Biochem.**, v. 7, p. 27-33, 1968.

FREITAS, R. F. S., CUSSLER, E. L. Temperature sensitive gels extraction solvents. **Chem. Eng. Sci.**, v. 42, n. 1, p. 97-103, 1987.

FREY, E. K. Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierenätigkeit. **Arch. Klin. Chir.**, v. 142, p. 663-668, 1926  
apud SCHACHTER, M. Kallikreins (kininogenases). A group of serine proteases with bioregulatory actions. **Pharmacol. Review**, v. 31, p. 1-17, 1980.

FREY, E. K., KRAUT, H. Ein neues kreishaufhormon und seine wirkung. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol, v. 133, p. 1-56, 1928 apud SCHACHTER, M. Kallikreins (kininogases). A group of serine proteases with bioregulatory actions. Pharmacol. Review, v. 31, p. 1-17, 1980.

FREY, E. K., KRAUT, H., WERLE, E. (editors). Natürliche inhibatoren der kallikreine. In: Das kallikrein-kinin-system und serine inhibatoren. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1930, p. 114-142 apud FRITZ, H. FINK, E., TRUSCHEIT, E. Kallikrein inhibitors. Fed. Proc., v. 38, n. 13, p. 2753-2759, 1979.

FRITZ, H., FIEDDLER, F. DIETL, T. et al. On the relationships between porcine, pancreatic, submandibular and urinary kallikrein. In: HARBELAND, G. L., COHEN, J.W., SUZUKI, T. Kininogenases, Schattauer, New York: Stuttgart, 1977, v.4, p. 15-28.

FRITZ, H., FINK, E., TRUSCHEIT, E. Kallikrein inhibitors. Fed. Proc., v. 38, n. 13, p. 2753-2759, 1979.

FRITZ, H., WUNDEIER, G. Arzneim-Forsch, v. 33, p. 479-494, 1983 apud PINTIGNY, D., DACHARY-PRINGENT, J. Aprotinin can inhibit the proteolytic action of thrombin - a fluorescence

and an enzymatic study. *Eur. J. Biochem.*, v. 207, p. 89-95, 1992.

FUJIMOTO, Y., MORIWAKI, C., MORIYA, H. Studies on human salivary kallikrein. *J. Biochem.*, v. 74, p. 247-252, 1973.

FUNATSU, M., HIROMI, K., IMAHORI, K. et al. **Proteins, structure and function**. New York: J. WILEY, 1972, v. 1, 381 p.

GEIGER, R., FRITZ, H. Human urinary kallikrein. In: LORAND, L. (Ed). **Proteolytic enzymes; part C**. New York: Academic Press, 1981. p. 466-492. (Methods in Enzymology, 80).

GEIGER, R., MANN, K., BETTELS, T. Isolation of human urinary kallikrein by affinity chromatography. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, V. 15, P. 479-483, 1977.

GEIGER, R., MISKA, W. Human tissue kallikrein. In: SABATO, G.(Ed.). **Immunochem. Tech.: Part M. Chemotaxis and Inflammation**. San Diego: Academic Press, 1988. 819 p. Cap. 10, p. 102-115 (Methods in Enzymology, 163).

GEIGER, R., STUCKSTEDTE, U. FRITZ, H. Isolation and characterization of human urinary kallikrein. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, v. 361, p. 1003-1016, 1980.

- GIUSTTI, E. P., SAMPAIO, C. A. M., MICHELACCI, Y. M. et al.  
Horse urinary kallikrein I. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v.  
369, p. 369-387, 1988.
- GREEN, N. M., WORK, E. Pancreatic trypsin inhibitor. 2.  
Reaction with trypsin. **Biochem. J.**, v. 54, p. 347-352,  
1953.
- GREENBAUM, L., OKAMOTO, H. T-cinin and T-cininogen. In: DI  
SABATO, Giovanni(ed.) **Immunochemical Techniques; Part M:  
Chemotaxis and Inflammation**. San Diego: Academic Press,  
1988. 819 p. Cap. 24, p. 272-282 (Methods in Enzymology,  
163).
- GUTFREUND, H., STURTEVANT, J. M. **Biochem. J.**, v. 63, p. 656,  
1956 apud FUNATSU, M., HIROMI, K., IMAHORI, K. et al.  
**Proteins, structure and function**. New York: J. WILEY, 1972,  
v. 1, 381 p.
- HABERMANN, E. Strukturaufklärung kininliefernder peptide aus  
rinderserum-kininogen. **Naunyn Schmiedelbergs Arch. exp.  
Path. Pharmac.**, v. 253, p. 474-483, 1966.
- HAN, Y. N., KATO, H. IWANAGA, S. et al. **FEBS Letters**, v. 63,  
p. 197-200, 1976 apud BODE, W., CHEN, Z., BARTELS, K.  
Refined 2 A X-ray crystal structure of porcine pancreatic

kallikrein A, a specific trypsin-like serine proteinase. **J. Mol. Biol.**, v. 164, p. 237-282, 1983.

HIAL, v., DINIZ, C. R., MARES-GUIA, M. Purification and properties of a human urinary kallikrein (kininogenase). **Biochemistry**, v. 13, p. 4311-4318, 1974.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination on chymotripsin, trypsin and thrombin. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, p. 1393-1399, 1959.

IWANAGA, S., HAN, Y. N., KATO, H. et al. In: **Kininogenases 4** (HABERLAND, G. L., ROHEN, J. W., SUZUKI, T. eds), p. 79-90, Schattauer, Stuttgart and New York.

IZQUIERDO, C., BURGUILLO, F. J., USERO, J. et al. Kinetic study of the inhibition of the amidolytic activity of thrombin by benzamidine and N-dansyl-(p-guanidino)-phenylalanine-piperidide (I-2581). **Intern. J. Biochem.**, v. 19, p. 1105-1112, 1987.

JUNQUEIRA, R. G. Inibição parabólica em tripsina e serino-proteases relacionadas: uso de bis benzamidinas na demonstração cinética de sítio secundário de ligação. Belo Horizonte: UFMG, 1992. p.(Tese, Doutorado em Ciências).

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 1992.

JUNQUEIRA, R. G., SILVA, E., MARES-GUIA, M. Competitive parabolic inhibitor of bovine trypsin by bis-benamidines. **Brazilian j. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 873-887, 1992.

KASSEL, B. Bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz inhibitor, basic pancreatic trypsin inhibitor, polyvalent inhibitor from bovine organs). **Methods in Enzymology**, v. 19, p. 844-852, 1970.

KELLERMANN, J. LOTTSPEICH, F. GEIGER, R. et al. Human urinary kallikrein: amino acid sequence and carbohydrate attachment sites. In: ABE, K., MORIYA, H. FUJII, S. **Kinins V. Part A**. New York: Plenum Press, 1987, p. 519-525, (Advances in Experimental Medicine and Biology, 247 A).

KITAMURA, N., TAKAGAKI, Y., FURUTO, S. et al. A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens. **Nature**, v. 305, n. 6, p. 545-549, 1983.

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 apud FRITZ, H., FINK, E., TRUSCEIT, E.

Kallikrein inhibitors. **Fed. Proc.**, v. 38, n. 13, p. 2753-2759, 1979.

LEVINSKY, N. G., OLE-MOIOYOI, O., AUSTEN, K. F. et al. Measurement of human urinary kallikrein and evidence for non-kallikrein urinary TAME esterases by direct immunoassay and by affinity chromatography. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 28, p. 2491-2495, 1979.

LIMA, R. S. Calicreínas urinárias humanas (HUK) A, B e D: isolamento, purificação e propriedades. Belo Horizonte: UFMG, 1986. 101 p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica). Instituto de Ciências Biológicas - UFMG - 1986.

MACDONALD, R. J., MARGOLIUS, H. S., ERDÖS, E. G. Molecular biology of the tissue kallikreins. **Biochem. J.**, v. 253, p. 313-321, 1988.

MARES-GUIA, M. Hydrophobic interactions in the trypsin active center. The sensitivity of the hydrophobic site chain modifications in the competitive inhibitors of the amidinium type. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 127, p. 317-322, 1968.

MARES-GUIA, M., DINIZ, R. C. Studies of the mechanism of rat urinary kallikrein catalysis, and its relation to catalysis

by trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 121, p. 750-756, 1967.

MARES-GUIA, M., SHAW, E. Studies on the active center of trypsin: the binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *J. Biol. Chem.*, v. 240, n. 4, p. 1579-1585, 1965.

MATSUDA, Y., AKIHAMA, S., FUJIMOTO, Y. Rat submaxillary gland kallikrein purification and some properties. *Jap. J. Clin. Chem.*, v. 15, p. 131-139, 1986.

MATSUDA, Y., MIYAZAKI, C., MORIYA, H. et al. Studies on urinary kallikreins. *J. Biochem.*, Tokyo, v. 80, p. 671-679, 1976.

MILLER, D. H., CHAO, J., MARGOLIUS, H. S. Tissue kallikrein synthesis and its modification by testosterone or low dietary sodium. *Biochem. J.*, v. 218, p. 37-43, 1984.

MIRANDA, T. L. S. Utilização do gel termosensível poli(N-isopropilacrilamida) na concentração de urina humana visando a obtenção de calicreína humana em grande escala. Belo Horizonte: UFMG, 1990. 152p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 1990.

- MIRANDA, T. L. S., RAMOS, C. H. I., FREIRE, R. T. S. et al. Kinetic mechanism of the inhibition of human urinary kallikrein by basic pancreatic trypsin inhibitor. **Brazilian J. Med.**, v. 28, p. 505-512, 1995.
- MORICHI, S., SAKO, E., HASEGAWA, E. et al. Large-scale purification and characterization of human urinary kallikrein. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 32, n. 3, p. 1152-1162, 1983.
- MORIYA, H., MATSUDA, Y., FUJIMOTO, Y. et al. Some aspects of multiple components on the kallikrein. Human urinary kallikrein (HUK). In: HABERLAND, G. L., ROHEN, J. W. **Kininogenases-kallikrein**. Stuttgart, New York: Schattauer, 1973.
- MORIYA, H., MATSUDA, Y., MIYAZAKI, C. et al. Some aspects of urinary kallikrein and renal kallikrein. In: HABERLAND, G. L., COHEN, J. W., SUZUKI, T. **Kininogenases**. Stuttgart, New York: Schattauer, 1977, v. 4, p. 225-228.
- MORIYA, H., PIERCE, J. V., WEBSTER, M. E. Purification and some proprieties of three kallikreins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 104, p. 172-185, 1963.

- MÜLLER-ESTERL, W. IWANAGA, S., NAKANISHI, S. Kininogens revisited. *Trends in Biochem. Sci.*, v. 11, p. 336-339, 1986.
- MÜLLER-ESTERL, W., JOHNSON, D. A., SALVESEN, G. et al. Human kininogens. In: SABATO, G. D. (ed.). **Chemotaxis and inflammation**; part M. New York: Academic Press, 1988. Cap. 21, p. 240-256. (Methods in enzymology, 163).
- MÜLLER-ESTERL, W., RAUTH, G. LOTTSPREICH, F. et al. Limited proteolysis of human low-molecular-mass kininogen by tissue kallikrein. *Eur. j. Biochem.*, v. 149, p. 15-22, 1985.
- MURTHY, K. K., CARRETERO, O. A. SCICLI, G. Purification and characterization of canine urinary kallikrein. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 244, n. 2, p. 563-571, 1986.
- NUSTAD, K., PIERCE, J. V. Purification of rat urinary kallikrein and their specific antibody. *Biochemistry*, Washington, v. 13, p. 2312-2319, 1974.
- OKAMOTO, H., GREENBAUN, L. M. Isolation and structure of T-Kinin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 112, n. 2, p. 701-708, 1983.

- OLE-MOIYOI, O., AUSTEN, K. F., SPRAGG, J. Kinin-generating and sterolytic activity of purified human urinary kallikrein (urokallikrein). *Biochem. Pharmacol.*, v. 26, p. 1893-1900, 1977.
- OLE-MIOYOI, O., SPRAGG, J. AUSTEN, K. F. Structural studies of human urinary kallikrein (urokallikrein). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 76, p. 3121-3125, 1979.
- OLIVEIRA, L., ARAÚJO-VIEL, M. S., JULIANO, L. et al. Substrate activation of porcine pancreatic kallikrein by N- $\alpha$ -derivates of arginine 4-nitroanilides. *Biochem.*, v. 26, n. 16, p. 5032-5035, 1987.
- OLIVEIRA, M. G. A., ROGANA, E., ROSA, J. et al. Tyrosine 151 is part of the substrate activation a binding site of bovine trypsin. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 26893-26903, 1993.
- OZA, N. B., RYAN, J. W. A simple high-yield procedure for isolation of human urinary kallikrein. *Biochem. J.*, Colchester, v. 171, p. 285-288, 1978.
- PENA, H. B. Calicreína  $\alpha$  de glândulas submandibulares de rata: purificação completa e caracterização. Belo Horizonte: UFMG, 1990. 122 p. (Dissertação, mestrado em

Bioquímica). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1990.

PETTERSSON, G., PETTERSSON, I. Statistical methods for determination of empirical rate equations for enzyme reactions. **Acta Chem. Scand.**, v. 24, p. 1275-1286, 1970.

PINTIGNY, D., DACHARY-PRINGENT, J. Aprotinin can inhibit the proteolytic action of thrombin - a fluorescence and an enzymatic study. **Eur. J. Biochem.**, v. 207, p. 89-95, 1992.

PLOWMAN, K. M. Inhibitor studies. In: HUME, D. N., STORK, G., KING, E. L. et al. (ed), **Enzyme kinetics**. Mcgraw-Hill Book Company, New York, 1972, p. 56-75.

PRADO, J. L. Kininogenases, plasmakinin-liberating enzymes. **Ciencia Cult.** (São Paulo), 14, 231, 1962.

PRADO, E. S., PRADO, J. L., BRANDI, C. M. W. Further purification and some properties of horse urinary kallikrein. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 137, p. 358-374, 1962.

PRADO, E. S., PRADO, J. L., BRANDI, C. M. W. Kallidin (Lysylbradykinin), the cinin formed from horse plasma by horse urinary kallikrein. **Biochem. Pharmacol.**, v. 20, p. 2009-2015, 1971.

- PRADO, E. S., ARAÚJO-VIEL, M. S., JULIANO, M. A. et al. Tetrapeptide substrates for the discrimination among kallikreins and other trypsin-like serine proteinases. **Biol. chem. Hoppe-Seyler**, v. 67, p. 199-205, 1986.
- PRADO, E. S., CHAO, J., CHAGAS, J. R. et al. Determinants of tissue kallikrein cleavage specificity in the limited proteolysis of kininogens. **Agents and Actions (supplements)**, v. 38, p. 74-81, 1992.
- ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W. T., ROSENFELD, G. Bradykinin a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Amer. J. Physiol.**, v. 156, p. 261-273, 1949.
- RODRIGUES, C. V. Efeito de cátions e detergentes sobre a atividade enzimática da calicreína submandibular de rato e estudos cinéticos com o substrato N $\alpha$ -benzoil-L-arginina etil éster. Belo Horizonte: UFMG, 1993. 153 p. (Dissertação, mestrado em Bioquímica). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.
- ROGANA, E., NELSON, D. L., MARES-GUIA, M. Characterization of the ultraviolet absorption spectra of para-substituted

derivatives of benzamidine. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 97, p. 6844-6848, 1975.

SCHACHTER, M. Kinins of different origins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 104, p. 108, 1963.

SCHACHTER, M., THAIN, E. M. Chemical and pharmacological properties of the potent slow contracting substance kinin in vesp venom. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 9, p. 353-359, 1954.

SCHECHTER, I., BERGER, A. On the size of active site in proteases I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 12, p. 157-162, 1967.

SILVA, E., DINIZ, C. R., MARES-GUIA, M. Rat urinary kallikrein: purification and properties. *Biochemistry*, v. 13, n. 21, p. 4304-4310, 1974.

SOUSA, M. O. Caracterização cinética da calicreína submandibular de glândulas de rato com substratos sintéticos N- $\alpha$ -derivados da arginina e inibidores naturais e sintéticos. Belo Horizonte: UFMG, 1993. 166 p. (Dissertação, mestrado em Bioquímica). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.

STERLING, T. D. POLLACK, S. V. Introduction to statistical data processing, Prentice-Hall, Eaglewood Cliffs, New Jersey, 376 p., 1968 apud PETERSSON, G., PETERSSON, I. Statistical methods for determination of empirical rate equations for enzyme reactions. **Acta Chem. Scand.**, v. 24, p. 1275-1286, 1970.

TABY, O., CHABBAT, J., STEINBUCH, M. Thromb. Res., v. 59, p. 27-35, 1990 apud PINTIGNY, D., DACHARY-PRINGENT, J. Aprotinin can inhibit the proteolytic action of thrombin - a fluorescence and an enzymatic study. **Eur. J. Biochem.**, v. 207, p. 89-95, 1992.

TAKADA, Y., SKIDGEL, R. A. ERDÖS, E. G. Purification of human urinary pro kallikrein. **Biochem. J.**, Geat Britain , v. 232, p. 815-858, 1985.

TAKAOKA, M., AKIYAMA, H., OKAMURA, H. et al. Isolation of inactive kallikrein from rat urine. **Bioch. Biophys. Res. Comm.**, v. 109, n. 3, p. 841-847, 1982.

TROWBRIDGE, C. G., KREHBIEL, A., LASKOWSKI, M. Substrate activation of trypsin. **Biochemistry**, v. 2, p. 843-850, 1963.

- TSUNEMATSU, H., IMAMURA, T. MAKISUMI, S. Kinetics of hidrolysis of N $\alpha$ -benzoyl-p-guanidino-L-phenylalanine p-nitroanilide by trypsin. *J. Biochem.*, v. 94, p. 171-179, 1984.
- TSCHESCHE, H., MAIR, G., GODEK, G. et al. The primary struture of porcine glandular kallikrein. In: FUJII, S., MORIYA, H., SUZUKI, T. **Kinins II**, Biochemistry, Pathophysiology, and Clinical aspects, New York: Plenum Press, 1979. p. 245-260, (**Adv. in Exp. Med. and Biol.**, 120 A).
- TÚNON, P., JOHANSON, K. E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in PAGE. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 8, p. 171-179, 1984.
- UCHIDA, K. NIINOBE, M., KATO, H. et al. Purification and properties of rat stomach kallikrein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 614, p. 501-510, 1980.
- VOGEL, R. WERLE, E. Kallikrein inhibitors. In: ERDÖS, E. G., WILDE, A. F. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 25, Berlin; Springer-Verlag, 1970. 768 p., p. 213-249.
- WEBER, K., OSBORN, M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. In: HIRS, C. H. W.,

TIMASHEFF, S. N. **Enzyme structure**; Part C. New York: Academic Press, 1972. cap. 1, p. 3-27. (Methods in Enzymology, XXVI).

WEBSTER, M. E. Report of the committee on nomenclature for hypotensive peptides. In: **Hypotensive peptides**, p. 684, ERDÖS, E. G., BACK, N., SCUTERI, F. (eds). Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1966.

WERLE, E., GÖTZE, W., KEPPLER, A. Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontaktierende Substanz. *Biochem. Z.*, v. 289, p.217-237, 1937 apud SCHACHTER, M. Kallikreins (kininogenases), a group of serine proteases with bioregulatory actions. **Pharmacol. Review**, v. 31, n. 1, p. 1-17, 1980.

WILKINSON, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochem. J.**, v. 80, p. 324-332, 1961.

WOODLEY, C. M., CHAO, J. MARGOLIUS, H. S. et al. Specific identification of tissue kallikrein in exocrine tissue and in cell-free translation products with monoclonal antibodies. **Biochem. J.**, v. 231, p. 721-728, 1985.

XIONG, W., CHAO, L., CHAO, J. Renal kallikrein mRNA localization by in situ hybridization. **Kidney Int.**, v. 35, p. 1324-1329, 1989.

YANO, M., MAGASAWA, S., SUZUKI, T. Partial purification and some properties of high molecular weight kininogen, bovine kininogen-I. **J. Biochem.**, v. 69, p. 471-481, 1971.