

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

CLÁUDIA MORAIS VIVAS

ENSAIOS ENZIMÁTICOS COM SERINO PROTEASES

a) CALICREÍNA TECIDUAL DO RATO

b) β -TRIPSINA BOVINA

Belo Horizonte

2007

CLÁUDIA MORAIS VIVAS

ENSAIOS ENZIMÁTICOS COM SERINO PROTEASES

a) CALICREÍNA TECIDUAL DO RATO

b) β -TRIPSINA BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo

BELO HORIZONTE

2007

V856e Vivas, Cláudia Morais
Ensaio enzimático com serino proteases – a) Calicreína tecidual do rato; b) β -Tripsina bovina / Cláudia Morais Vivas. – 2007.
114 f. : il.

Orientador: Prof. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Calicreína - Teses. 2. Tripsina - Teses. I. Figueiredo, Amintas Fabiano de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD 574.192

A Deus, aos meus pais, ao Augusto, João e Clara com todo o meu carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e força para a realização deste trabalho.

Ao Augusto, pelo apoio e colaboração em todos os momentos, sem os quais seria impossível a conclusão desta etapa.

Ao meu pai João e minha mãe Sílvia pela torcida, pelas orações e pela ajuda que sempre me deram nos momentos que precisei.

Aos meus filhos João e Clara, pela compreensão.

Aos meus irmãos e à minha sogra por torcerem por mim e por me ajudarem quando precisei.

Ao meu sogro Prof. Dr. Eduardo Osório Cisalpino e à minha cunhada e amiga Prof. Dra Patrícia Silva Cisalpino por terem me ingressado na vida acadêmica e pelo apoio constante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo, pela orientação deste trabalho, pela dedicação, paciência, apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro, pela análise dos dados, pela atenção e colaboração inestimável neste trabalho.

Ao Prof Dr. Ricardo José Alves pela atenção, incentivo e confiança.

Aos professores e colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia pela atenção e incentivo.

À colega de mestrado Carolina Matias Diniz pela amizade, incentivo e colaboração ao longo desta jornada.

Aos professores e colegas do Colégio Técnico da UFMG, Prof. Dr. Jenner Karlisson Reis, Prof^a. Dra Karina Borges, Prof. Dr. Eduardo F.Coelho e Rejane Diniz, pela atenção, colaboração, amizade e incentivo.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela atenção.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Rosemary e Jurema, pela paciência e atenção dispensados.

Aos meus familiares, amigos e a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

“A mente que se abre para uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

CALICREINA TECIDUAL DO RATO

	LISTA DE TABELAS	13
	LISTA DE FIGURAS	14
	LISTA DE ABREVIATURAS	15
	RESUMO	16
	ABSTRACT	18
1	INTRODUÇÃO	20
1.1	SERINO PROTEASES	21
1.2	SISTEMA CALICREÍNA-CININA	24
1.2.1	Calicreínas	24
1.2.2	Cininas	30
1.2.3	Cininogênios	31
1.2.4	Calicreína Tecidual Cardíaca	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	AMOSTRA	39
3.1.1	Preparação da amostra	39

3.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	40
3.3	MATERIAL E EQUIPAMENTOS	42
3.4	MÉTODOS	43
3.4.1	Determinação da Concentração de Proteínas	43
3.4.2	Preparação do padrão de albumina de soro bovino (BSA) 0,5 mg/mL	44
3.4.3	Determinação da atividade amidásica da calicreína tecidual do rato (rK1)	47
3.4.4	Ativação da pré-calicreína tecidual nos extratos dos pós renal e de coração do rato com a β-tripsina bovina	50
3.4.5	Determinação da atividade amidásica da calicreína tecidual do rato após ativação da pré-calicreína pela β-tripsina ..	51
4	RESULTADOS	55
4.1	TEOR EM PROTEÍNAS E ATIVIDADES AMIDÁSICAS COM O SUBSTRATO BZ-ARG-NAN DOS DIVERSOS EXTRATOS ENSAIADOS	56
4.2	TEOR EM PROTEÍNAS E ATIVIDADES AMIDÁSICAS DOS EXTRATOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM B-TRIPSINA BOVINA COM O SUBSTRATO BZ-ARG-NAN.	57
4.3	TEOR EM PROTEÍNAS E ATIVIDADES AMIDÁSICAS DOS EXTRATOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM B-TRIPSINA BOVINA COM O SUBSTRATO D-VAL-LEU-ARG- NAN.....	58

		10
4.4	ATIVIDADES AMIDÁSICAS DOS EXTRATOS DE PÓ RENAL	60
4.5	COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES AMIDÁSICAS DOS EXTRATOS DOS PÓS DE CORAÇÃO, RIM, GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES E URINA.	60
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO	66

β -TRIPSINA BOVINA

1	INTRODUÇÃO	67
1.1	TRIPSINA	68
2	OBJETIVOS	73
2.1	OBJETIVO GERAL	74
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	74
3	MATERIAL E MÉTODOS	75
3.1	MATERIAL E EQUIPAMENTOS	76
3.2	OBTENÇÃO DA β-TRIPSINA BOVINA (β-TRB) PURIFICADA	77
3.3	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO DA β-TRIPSINA BOVINA	77
3.4	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE 4-NITROANILINA (4-NAN)	78
3.5	MÉTODOS	78
3.5.1	Estudo cinético da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg- Nan catalisada pela β-tripsina bovina	78
3.5.1.1	Determinação da concentração real do substrato	79
3.5.1.2	Cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β-TRB, na ausência e na presença da 4-Nan	80
3.5.2	Tratamento dos dados cinéticos	82
3.5.3	Análise estatística dos dados cinéticos	84

3.5.4	Estudo da estabilidade da solução estoque da β -tripsina bovina	85
4	RESULTADOS	86
4.1	INIBIÇÕES DA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA β -TRIPSINA BOVINA (β -TRB) PELA 4-NITROANILINA (4-NAN) COM O SUBSTRATO D-VAL-LEU-ARG-NAN	87
4.2	ESTUDO DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO ESTOQUE DA β -TRIPSINA BOVINA	89
5	DISCUSSÃO	94
5.1	CINÉTICA DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA β -TRIPSINA BOVINA (β -TRB) PELA 4-NITROANILINA (4-NAN), COM O SUBSTRATO D-VAL-LEU-ARG-NAN	95
5.2	PERSPECTIVAS	101
6	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Concentrações em m/v e em proteínas dos extratos do pó de coração e atividades amidásicas específicas com Bz-Arg-Nan 57
- TABELA 2 Concentrações em m/v e em proteínas dos extratos do pó de coração e atividades amidásicas específicas com D-Val-Leu-Arg-Nan..... 58
- TABELA 3 Atividades amidásicas dos extratos dos pós de coração, rim, glândula submandibular e do pó urinário de rato com D-Val-Leu-Arg-Nan ... 61
- TABELA 4 Valores dos parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela β -TRB na ausência e na presença da 4-NAn 88
- TABELA 5 Valores das constantes de inibição, K_i e K_i' , para a inibição da β -TRB pela 4-NAn 89

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Desenho esquemático do centro ativo da calicreína humana, mostrando as interações das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos P₁, P₂, P₃ e P₁' do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan com os subsítios S₁, S₂, S₃ e S₁' da enzima.....23
- FIGURA 2 Ativação da cascata da coagulação envolvendo Fator XII e a pré-calicreína.....27
- FIGURA 3 Formação de cininas pela ação enzimática das calicreínas teciduais e plasmáticas sobre os cininogênios32
- FIGURA 4 Gráfico de Michaelis-Menten para hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β-tripsina bovina, na ausência e na presença de 4-NAn.. 90
- FIGURA 5 Gráfico de Lineweaver-Burk para hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β-tripsina bovina, na ausência e na presença de 4-NAn...91
- FIGURA 6 Gráfico de Hanes-Woolf para hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β-tripsina bovina, na ausência e na presença de 4-NAn.. 92
- FIGURA 7 Gráfico dos parâmetros cinéticos K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} e $1/k_{cat}^{ap}$ da β-tripsina bovina em função da concentração da 4-NAn 93

LISTA DE ABREVIATURAS

An	anilina
Arg	arginina
ATP	adenosina trifosfato
β -TRB	β -tripsina bovina
BzA	benzamidina
Bz-Arg-Nan	N α -benzoil-L-arginina-p-nitroanilida
D-Val-Leu-Arg-Nan	D-valil-L-leucil-L-arginina-4-nitroanilida
hK1	calicreína tecidual humana
hK2	calicreína glandular humana
hK3	antígeno prostático específico
kcat	constante catalítica
k_{cat}/K_m	constante de especificidade
K_i	constante de dissociação do complexo enzima-inibidor
K_m	constante de Michaelis
Lis	lisina
4-NAn	4-nitroanilina
p-ABzA	p-aminobenzamidina
SBTI	inibidor básico de tripsina isolada de soja
Tyr	tirosina

RESUMO

A calicreína tecidual e a tripsina são serino proteases, enzimas proteolíticas que desempenham um papel importante na regulação de muitos processos fisiológicos e estão associadas a muitas doenças, incluindo cardiopatias, câncer, pancreatite, artrite e enfisema. O objetivo deste trabalho foi a caracterização cinética da calicreína tecidual do rato (rK1) isolada do coração para posterior comparação dos resultados com dados relativos publicados na literatura para a calicreína tecidual humana (hK1). Foram utilizados pós liofilizados provenientes de 150 corações, de 300 glândulas submandibulares e de 300 rins removidos de ratos Wistar adultos e urinário de rato. Foram preparados vários extratos utilizando tampões e processos diferentes, a fim de se otimizar a extração. Em cada extrato foram determinadas a concentração de proteínas pelos métodos de Bradford e de Peterson e a atividade amidásica com os substratos Bz-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan. Os resultados das atividades amidásicas específicas nos extratos do coração, do rim e da glândula submandibular, e urinário foram comparados. Como as atividades amidásicas específicas nos extratos de coração foram muito baixas, a purificação da calicreína a partir desses extratos, com o objetivo de caracterizá-la, foi abandonada. Por isso, outro estudo foi realizado, a caracterização cinética da β -tripsina bovina (β -TRB) com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, na ausência e na presença do inibidor 4-nitroanilina (4-NAn). A tripsina é um bom modelo experimental para caracterização das serino proteases e o estudo da inibição enzimática é importante no esclarecimento do mecanismo de ação enzimática, e no conhecimento dos compostos que interagem especificamente com estas enzimas, pois podem ser úteis no tratamento de várias doenças. As hidrólises, catalisadas pela β -TRB, do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, em pH 8,1 a 37°C, foram estudadas na ausência e na presença de concentrações crescentes da 4-NAn, um dos produtos da

reação enzimática. Os resultados mostraram que as hidrólises seguem à cinética de Michaelis-Menten, em toda a faixa de concentração de substrato utilizada. A 4-NAn apresentou dois comportamentos de inibição: em concentrações baixas foi caracterizada como inibidor misto linear, e em concentrações mais elevadas, a inibição foi caracterizada como parabólica. A inibição parabólica indica a presença de um segundo sítio de ligação para o inibidor na enzima, além do seu centro ativo. A 4-NAn inibe a β -TRB combinando-se com a mesma afinidade, no seu centro ativo e no seu segundo sítio. Além da importância do estudo da inibição enzimática mencionada acima, o conhecimento da inibição da β -TRB pela 4-NAn é relevante, visto que, este composto é um dos produtos de hidrólise de substratos, do tipo anilida.

ABSTRACT

Tissue kallikrein and trypsin are serino proteases, protolytic enzymes that play an important role in the regulation of many physiological processes and that are related to many diseases including heart-related diseases, cancer, pancreatitis, arthritis, and emphysema. The aim of the present study was to establish the kinetic profile of rat tissue kallikrein (rK1) isolated from its heart and to compare results with human tissue kallikrein (hK1) profile described previously elsewhere. One hundred and fifty lyophilized and pulverized hearts, three hundred submandibular glands, and three hundred kidneys of adult Wister rats, and rat urinary were prepared in various extracts with different concentrations, buffers and processes in order to optimize the extraction. In each extract sample, the protein concentration was determined using the Bradford method and the Peterson method. The rK1 amidase activity was determined with Bz-Arg-Nan and D-Val-Leu-Arg-Nan substrates. The results of the specific amidase activities in the heart, kidney and submandibular glands extracts, and the rat urinary extract have been compared. As the specific amidase activities in the heart extracts were very low, the kallikrein purification aiming at its characterization was abandoned. Then, another study has been done, the bovine β -trypsin kinetic characterization using D-Val-Leu-Arg-Nan substrate, in the absence and the presence of 4-nitroaniline inhibitor (4-NAn). The trypsin is a good experimental model for serino proteases characterization and the investigation of enzymatic inhibition is important to the establishment of enzyme action mechanism and to know about the specific interaction between the inhibitors and the enzymes, being possible the use of this knowledge in various diseases therapy. The hydrolyses of D-Val-Leu-Arg-Nan substrate, catalyzed by the bovine β -trypsin at pH 8,1 and 37°C were carried out in a gradient of 4-NAn concentration. The results showed that the hydrolyses followed the Michaelis-Menten kinetics on the wide range of

concentration substrate used. At low concentrations, the 4-NAn showed linear mixed inhibition, but at higher inhibitor concentrations, the parabolic inhibition was observed. The parabolic inhibition indicates the presence of a secondary binding site of the enzyme for the substrates besides its active center. The 4-NAn inhibits the enzyme binding with the same affinity to both its active center and the secondary site. Besides that, the inhibition of bovine β -trypsin by 4-NAn is interesting data found since this compound is a hydrolyses product of anilide substrates.

CALICREÍNA TECIDUAL DO RATO

1 INTRODUÇÃO

1.1 SERINO PROTEASES

Serino proteases são enzimas proteolíticas com um único resíduo de serina ativo no seu sítio catalítico. Elas representam aproximadamente 0,6% de todas as proteínas do genoma humano. Estão envolvidas em muitas funções fisiológicas como digestão, coagulação do sangue e fibrinólise, fertilização e ativação do complemento em respostas imunológicas e também, estão associadas a muitas doenças, incluindo câncer, artrite e enfisema (YOUSEF *et al.*, 2003).

As serino proteases são classificadas em 5 famílias distintas de enzimas: a da quimiotripsina, da subtilisina, da serino carboxipeptidase II, do citomegalovirus humano e do componente proteolítico ClpP da protease ATP-dependente (CZAPINSKA & OTLEWSKI, 1999).

As serino proteases exibem preferência para catalisar a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a uma classe particular de aminoácidos. No grupo das enzimas semelhantes à tripsina, as proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo os aminoácidos básicos arginina (Arg) e lisina (Lis), uma vez que elas têm um resíduo de aspartato ou glutamato na bolsa de ligação do substrato, que pode formar uma forte ligação eletrostática com aqueles resíduos (YOUSEF *et al.*, 2003).

O estudo da inibição enzimática por íons ou por moléculas específicas, como é proposto neste trabalho, é importante para o esclarecimento do mecanismo de ação da enzima, e estes conhecimentos são utilizados para produzir inibidores seletivos e específicos, possibilitando a síntese de novos fármacos (STRYER, 1988; DEMUTH, 1990).

As serino proteases desempenham um papel importante na regulação de muitos processos biologicamente relevantes como, por exemplo, a tripsina na digestão e a trombina na cascata da coagulação sangüínea. Esta classe de enzimas é um importante alvo na química medicinal contemporânea uma vez que, muitas doenças

são relacionadas a um mau funcionamento desta regulação. Assim, compostos que interagem especificamente com as serino proteases podem ser úteis no tratamento de várias doenças (TALHOUT & ENGBERTS, 2001).

As serino proteases são uma grande e conservada família proteolítica envolvida no crescimento tumoral, invasão e metástase (PIA NYBERG *et al.*, 2006).

Recentes estudos demonstraram que as serino proteases são fundamentais na manutenção das funções cardíacas e contribuem nos processos patológicos cardíacos. Em particular, tem-se identificado o papel importante da calicreína tecidual nos processos patológicos envolvidos na hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca e hipertensão (QINGYU, KUO & DENG, 2004).

Segundo Schechter e Berger (1967), o sítio ativo de uma enzima realiza a dupla função de combinação com o substrato e catálise da reação. A eficiência destas ações é que define a especificidade da enzima. O sítio de ligação de uma enzima é composto dos subsítios (S_1 - S_4 e S_1' - S_3'), localizados em ambos os lados do sítio catalítico. No substrato, os resíduos de aminoácidos que ocupam os subsítios, na enzima, são indicados pelas letras (P_1 - P_4 e P_1' - P_3'), correspondendo aos subsítios que eles ocupam. Na figura 1 está representada a interação de uma enzima com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan. As letras S_1 , S_1' , S_2 , S_3 representam os subsítios da enzima e as letras P_1 , P_1' , P_2 , P_3 representam as posições dos resíduos de aminoácidos no substrato. A enzima hidrolisa o substrato liberando a 4-nitroanilina, uma substância de cor amarela, que possui absorção máxima em 410 nm.

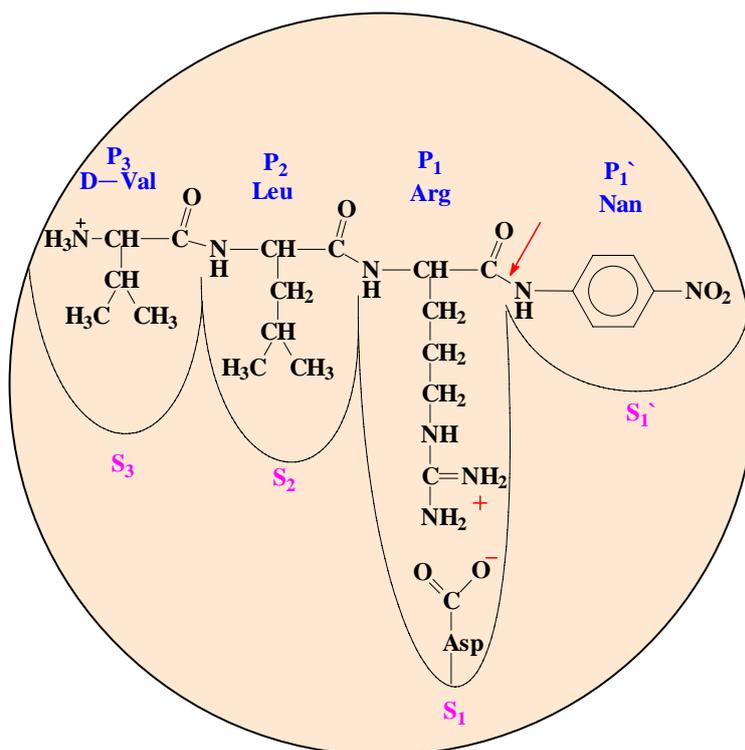


Figura 1- Desenho esquemático do centro ativo da caliceína tecidual humana, mostrando as interações das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos P₁, P₁', P₂, P₃ do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan com os subsítios S₁, S₁', S₂, S₃ da enzima.

Uma importante característica do sítio ativo das proteases é o seu tamanho. Na década de sessenta, estudos mostraram que o tamanho do sítio ativo nas proteases é maior do que o esperado e interações importantes ocorrem em regiões mais distantes do sítio catalítico. Este modelo (tamanho do sítio ativo e interações em subsítios distantes do sítio catalítico) foi confirmado por cristalografia de Raio-X na década de 1970. O modelo do sítio ativo dividido em subsítios, proposto há 40 anos, ainda é utilizado em pesquisas básicas para avaliação da atividade enzimática e em pesquisas farmacêuticas para o desenvolvimento de inibidores/fármacos (SCHECHTER, 2005).

1.2 SISTEMA CALICREÍNA-CININA

O sistema calicreína-cinina é constituído por: calicreínas, enzimas proteolíticas presentes em vários tecidos; cininogênios, proteínas do grupo das α_2 -globulinas, produzidos no fígado, que são substratos das calicreínas; cininas, peptídeos vasoativos e espasmogênicos resultantes da proteólise limitada dos cininogênios pelas calicreínas e cininases, enzimas proteolíticas que inativam as cininas.

1.2.1 Calicreínas

As calicreínas (EC 3.4.21.8) são um grupo da família das serino proteases e são encontradas em células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos. Elas, por ação enzimática, clivam substratos endógenos, conhecidos como cininogênios, produzindo peptídeos vasoativos, as cininas. Enzimas capazes de produzir cininas a partir de cininogênios, que estão presentes na linfa, plasma e fluidos intersticiais são denominadas cininogenases. (BHOOLA et al.,1992). Estas enzimas atuam de forma acentuada e indireta *in vivo* em vasos sanguíneos e músculo liso pela liberação de peptídeos farmacologicamente ativos (SCHACHTER, 1980).

A descoberta da calicreína iniciou-se na década de 20 quando E. K. Frey (1926) e E.K. Frey e H. Kraut (1928) observaram que a injeção intravenosa da urina de um cão em outro cão causava-lhe uma prolongada hipotensão arterial. Frey e Kraut observaram que a substância presente na urina do cão era não dialisável e termolábil. Frey e seus colaboradores consideraram a substância ativa como um hormônio e denominaram-na *Kreislaufhormon* (SCHACHTER, 1980).

Posteriormente, Frey, Kraut e Schultz (1930) verificaram que o conteúdo de um cisto, removido de um pâncreas humano, quando injetado, intravenosamente, em um

ção causava-lhe uma brusca diminuição na pressão sanguínea. Pela constatação de que o pâncreas constituía uma fonte rica dessa substância, a substância foi denominada calicreína, pois *Kallikréas* significa, em grego, pâncreas (BHOOLA *et al.*, 1992).

Com a continuidade de seus experimentos, Frey *et. al.* (1930) demonstraram que a extirpação do pâncreas causava uma acentuada diminuição da excreção da calicreína na urina e, logicamente, consideraram a calicreína como um hormônio pancreático. Continuando estes estudos, Werle (1932) demonstrou que a extirpação do pâncreas em cães, ao contrário de humanos, não apresentou diminuição da excreção urinária da calicreína. A partir dessa observação, constatou-se que a calicreína era produzida em outros órgãos, além do pâncreas (BHOOLA *et al.*, 1992).

Durante a pesquisa por outros órgãos que também produziam calicreína, as glândulas salivares também foram consideradas por já ser conhecida a capacidade da saliva de diminuir a pressão sanguínea quando injetada em cães. Em menos de 10 anos, foram caracterizadas calicreínas no pâncreas, urina, plasma e glândulas salivares, intestino, pulmões, cérebro e nervos.

Em 1937, Werle e colaboradores demonstraram que uma substância de baixo peso molecular e termoestável liberada enzimaticamente pela calicreína, apresentava ação contrátil sobre o músculo liso isolado de cobaia. Essa substância foi denominada DK (*darmkontrahierende substanz*) e, em 1948 foi chamada de calidina por Werle e Berek e seu precursor, o substrato para a calicreína, foi denominado calidinogênio (SCHACHTER, 1980).

Em 1949, Rocha e Silva e colaboradores demonstraram que a incubação do veneno de *Bothrops jararaca* e/ou tripsina com a fração globulínica do plasma resultava na formação de uma substância que produzia uma lenta e demorada contração do íleo isolado de cobaia. A contração era lenta quando comparada com a estimulação

provocada pela histamina ou acetilcolina. Em virtude dessa resposta lenta, a substância foi denominada bradiginina, pois *bradys* e *kinin* significam, em grego, lento e movimento, respectivamente (BHOOLA, 1992). Rocha e Silva e colaboradores observaram, ainda, que a ação da bradiginina não era antagonizada pela atropina ou por anti-histamínicos (ROCHA E SILVA, 1949).

Em 1954, Schachter e Thain introduziram o termo *cinina* para o grupo de peptídeos, ao qual pertenciam a calidina e a bradiginina, intimamente relacionados e que eram liberados de um substrato no plasma por calicreínas, tripsina, veneno de *Bothrops jararaca* e, possivelmente, por outras proteases.

Em 1960, Schachter *et. al.* introduziram o termo genérico *cininogenase* para todas as enzimas que liberam cininas e *cininogênio* para o substrato dessas enzimas (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

As calicreínas se dividem em dois grupos: calicreínas teciduais (EC 3.4.21.35) e plasmáticas (EC 3.4.21.34), as quais diferem entre si no peso molecular, ponto isoelétrico (pI), especificidade pelo substrato, características imunológicas, tipo de cinina produzida e importância funcional.

A calicreína plasmática (EC 3.4.21.34) é codificada por um único gene tanto no rato quanto no homem, rKLKB e KLKB1, respectivamente. A calicreína plasmática ou fator de Fletcher participa da ativação da coagulação sanguínea, fibrinólise, regulação do tônus vascular e inflamação. É sintetizada no fígado, como pré-calicreína, que circula no plasma, complexada ao cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e aos fatores XI e XII da cascata da coagulação. Assim, seguindo-se a uma lesão vascular, o HMWK estaciona-se sobre as superfícies endotelial e tecidual às quais ele permanece ligado por ligações eletrostáticas. A seguir, o fator XII é ativado (fator XIIa). O fator XIIa ativa a pré-calicreína em calicreína e o fator XI em fator XI ativo (XIa). Este ativa o fator IX, que por sua vez continua o processo da coagulação. A calicreína, por sua vez, ativa

a pré-caliceína. A conversão do plasminogênio em plasmina, pela caliceína plasmática, pelo fator XIIa e pelo fator XIa, promove a fibrinólise. Há, também, trabalhos na literatura indicando que a caliceína plasmática pode ativar a pró-uroquinase circulante. Estas informações mostram, claramente, que a caliceína plasmática é parte de uma importante via no processo da coagulação (FIG 2). A pré-caliceína com pl 8,9 existe em duas formas com massas moleculares de 85 e 88 kDa e ambas estão presentes no plasma. A caliceína plasmática, além de ativar a própria pré-caliceína e o fator XII, também atua sobre o cininogênio de alto peso molecular (HMWK), liberando a bradicinina (BHOOLA *et al.*,1992).

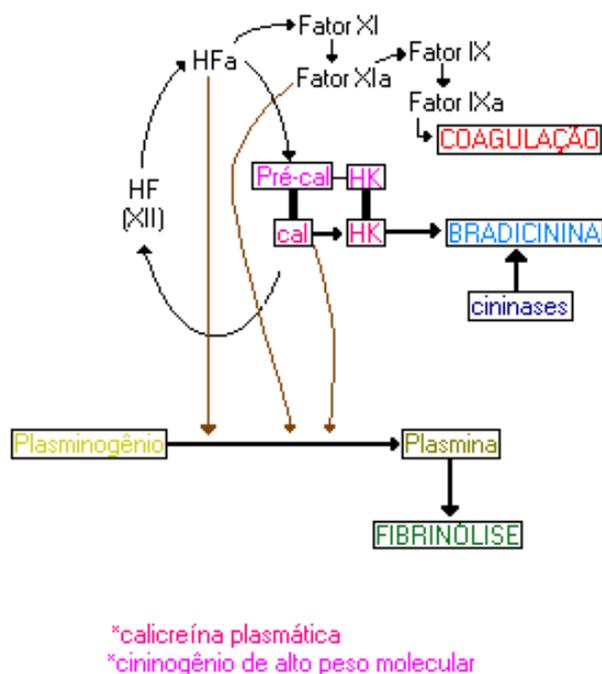


FIGURA 2: Ativação da cascata da coagulação envolvendo Fator XII e a pré-caliceína.

Fonte: BHOOLA *et al.*,1992

A calicreína plasmática exerce efeito importante sobre os leucócitos polimorfonucleares, o que pode ser de grande relevância no processo inflamatório (BHOOLA *et al.*, 1992).

Durante a sua formação, a calicreína plasmática é rapidamente inativada pelo inibidor C1, que tem a capacidade de, sozinho, inibir com alta afinidade a calicreína plasmática e o Fator XIIa. Além disso, a inibição da calicreína plasmática poderia ocorrer com a α 2-macroglobulina, a antitrombina III e com mutantes α 1-antitripsina mutante (BHOOLA *et al.*, 1992).

A calicreína tecidual (EC 3.4.21.35) pertence a uma grande família multigênica que apresenta semelhanças a nível genético, protéico e estrutural, e são encontradas em vários tecidos de mamíferos (YOUSEF & DIAMANDIS, 2001).

No homem, inicialmente pensava-se que a família genética das calicreínas era composta, apenas, de três membros: o gene KLK1 que codifica a calicreína tecidual pancreática e renal (hK1); o gene KLK2 que codifica a calicreína glandular humana (hK2) e o gene que codifica o antígeno prostático específico (hK3) ou PSA. Recentemente novos genes para as calicreínas e para enzimas semelhantes às calicreínas foram descobertos (YOUSEF *et al.*, 2000). Agora a família gênica das calicreínas foi totalmente caracterizada e inclui 15 membros, localizados seqüencialmente no cromossomo 19q13.4 (YOUSEF & DIAMANDIS, 2001). Das proteínas expressas pelos genes da família das calicreínas teciduais humanas apenas a hK1 é realmente uma calicreína, isto é, é a única enzima capaz de liberar a calidina do cininogênio de baixo peso molecular. As calicreínas teciduais são encontradas no pâncreas, glândulas salivares, intestinos, rins, plasma e soro.

Evidências sugerem que as calicreínas têm diversas outras funções, dependendo do tecido e das circunstâncias de expressão (BHOOLA *et al.*, 1992). Além da sua atividade cininogenase, a calicreína tecidual parece estar envolvida com fatores

de crescimento e hormônios peptídicos (MASON *et al.*, 1993), levando em consideração a sua presença na glândula pituitária, pâncreas e outros tecidos. Como citado por Bhoola *et al.* (1992), a calicreína tecidual é capaz de clivar a pró-insulina, a lipoproteína de baixa densidade (LDL), o precursor do fator natriurético atrial, a prorenina, o peptídeo vasoativo intestinal, a procologenase e o angiotensinogênio.

No rato, a família gênica das calicreínas teciduais pode compreender até 20 genes intimamente relacionados que mostram diversidade e variados modelos de expressão (BHOOLA *et al.*, 1992). Em 2003, Yousef e Diamandis publicaram um artigo em que afirmam, que no rato, a família das calicreínas teciduais tem 13 membros dos quais, pelo menos 10, são transcricionalmente ativos. As calicreínas teciduais do rato estão agrupadas na mesma região cromossomal e mostram um alto grau de homologia estrutural. Dez dos treze genes das calicreínas teciduais do rato codificam serino proteases potencialmente ativas, que têm 261 resíduos de aminoácidos. Admite-se que os três genes restantes sejam pseudogenes.

Como no homem e no camundongo, somente um gene rKLK1 codifica uma proteína que satisfaz a definição funcional de uma calicreína, a saber: libera uma cinina, a bradicinina, dos cinicogênios, o gene rKLK2 codifica a tonina, uma enzima que converte o angiotensinogênio em angiotensina II. O gene rKLK10 codifica uma cininogenase que hidrolisa o T-cininogênio liberando a T-cinina (YOUSEF & DIAMADIS, 2003).

Segundo Yousef e Diamandis (2003), recentemente, foi introduzido o conceito de família multigênica das calicreínas, no qual o termo genérico “calicreína tecidual” não está restrito à descrição de enzimas que liberam peptídeos bioativos de moléculas precursoras, mas, ao contrário, é usado para descrever um grupo de enzimas com estrutura genética e protéica altamente conservadas que, também compartilham considerável homologia na seqüência e se localizam no mesmo local cromossomal.

Assim, o termo calicreína não implica, necessariamente, que quaisquer dos membros dessa família (com exceção da hK1) tenham atividade cininogénica.

De fato, para os membros da família das calicreínas teciduais humanas que foram funcionalmente testados, encontrou-se que eles possuem muito baixa (hK2) ou nenhuma (hK3 ou PSA) atividade cininogénica. Esses genes são agrupados junto com o KLK1 baseando-se nas semelhanças estruturais e no mapa de localização genética (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

1.2.2 Cininas

As cininas liberadas pela calicreína são peptídeos vasoativos que influenciam vários processos biológicos. São substâncias hipotensoras, aumentam a permeabilidade vascular, são potentes produtoras de autacóides, contraem a musculatura lisa do pulmão, intestino e útero, e aumentam a motilidade de espermatozóides. No nível celular, promovem transporte de cloreto e glicose, liberando neurotransmissores, ativam a fosfolipase A2 e estimulam os osteoclastos. Quando produzidas, as diferentes cininas são inativadas rapidamente por peptidases chamadas cininases (BHoola *et al.*, 1992).

Até o momento, 2 tipos de receptores de cininas foram bem caracterizados, o receptor BK1 e o receptor BK2 (REGOLI *et al.*, 1990). Ambos os receptores BK1 e BK2 coexistem na mesma célula. Os receptores BK1 parecem estar presentes normalmente nas células, mas a sua expressão nas células do músculo liso e fibroblastos se tornam evidentes em estados patológicos, particularmente na inflamação e após exposição dos tecidos a estímulos nocivos.

1.2.3 Cininogênios

Os precursores das cininas, os cininogênios, são glicoproteínas de cadeia única, pertencentes ao grupo das α_2 -globulinas e estão presentes no plasma e líquidos biológicos.

Nos mamíferos três diferentes tipos de cininogênios já foram caracterizados e descritos, diferindo no tamanho, estrutura e funções biológicas (MÜLLER-ESTERL *et al.*, 1986): o cininogênio de alto peso molecular (HMW), com peso molecular variando de 88.000 a 114.000, dependendo da espécie de origem e o cininogênio de baixo peso molecular (LMW), com peso molecular variando de 50.000 a 68000. Um terceiro tipo de cininogênio, comumente designado como T-cininogênio, com peso molecular de aproximadamente 68000, é específico do rato e não é susceptível à clivagem proteolítica por calicreínas.

A principal função biológica da calicreína tecidual humana (hK1) é a hidrólise altamente seletiva da proteína plasmática cininogênio de baixo peso molecular, em duas diferentes ligações peptídicas, Met³⁷⁹-Lys³⁸⁰ e Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ para liberar, estequiometricamente, o decapeptídeo vasoativo e espasmogênico calidina (lisil-bradicinina). A proteólise limitada do cininogênio de alto peso molecular pela calicreína plasmática resulta em uma rápida liberação do nonapeptídeo bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) (FIG 2).

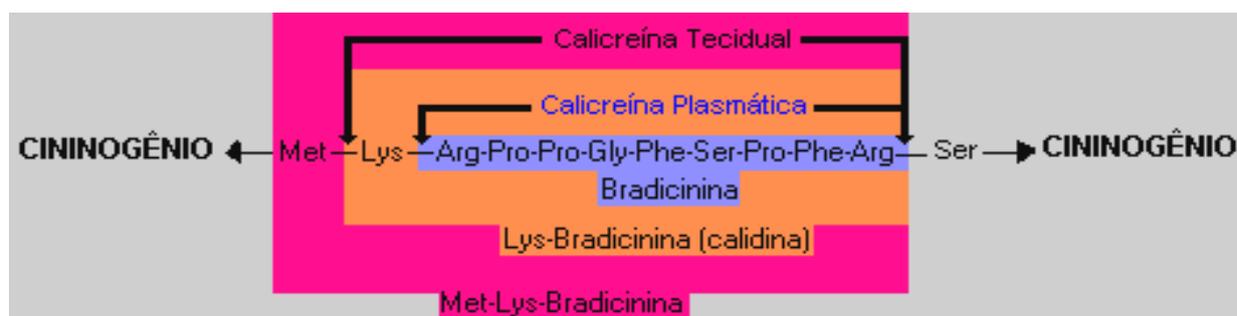


FIGURA 3: Formação de cininas pela ação enzimática das caliceínas teciduais e plasmáticas sobre os cininogênios.

Fonte: BHOOLA *et al.*, 1992

A relevância fisiológica de cada componente do sistema caliceína-cinina é revelar os importantes avanços da genealogia e da caracterização genética das caliceínas, cininogênios e cininases, e a biologia molecular dos receptores de cininas, sinais transmissores modulados por cininas, etc. A descoberta da presença da caliceína tecidual no neutrófilo e da expressão dos cininogênios de alto e baixo pesos moleculares, além da pré-caliceína plasmática na superfície neutrofílica, assegura um importante papel das cininas em doenças inflamatórias como artrite, asma, rinite alérgica e choque séptico.

Outra área que está sendo estudada é a associação do câncer com as caliceínas teciduais. A expressão dos genes da caliceína tecidual e a subsequente formação de cininas pode estimular a proliferação de células tumorais e, devido ao aumento da permeabilidade vascular, pode acentuar o poder metastático de tumores. A mais bem documentada relação entre as caliceínas e doenças tumorais é a descrita em malignidades endócrinas, tais como: tumores na próstata, mamas, testículo e ovário.

É possível que algumas caliceínas possam se tornar alvos terapêuticos valiosos a partir do momento em que os seus mecanismos biológicos estejam completamente

elucidados. Uma vez conhecidos, esses eventos podem ser manipulados através de indução ou ativação enzimática. Ainda, considerando o nível protéico dessas enzimas, há alguns relatos de que as calicreínas possam ser usadas como biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico do câncer. (YOUSEF & DIAMANDIS, 2003).

1.2.4 Calicreína Tecidual Cardíaca

Muitas células sintetizadoras de hormônios parecem conter serino proteases com propriedades enzimáticas muito similares à calicreína tecidual. Na década passada o coração ganhou importância como um órgão endócrino. Vários trabalhos permitiram mostrar a produção das cininas a partir dos cininogênios por ação enzimática em extratos brutos de tecidos cardíacos do rato, do cão, bovino e humano (NOLLY *et al.*, 1981). O sistema de geração das cininas tem uma grande importância na fisiopatologia das doenças cardíacas e as cininas parecem ter um papel regulatório na função cardíaca por ação direta na resistência vascular ou por indução de liberação de prostaglandinas.(NEEDLEMAN *et al.*, 1975).

Em 1990, Xiong *et al.* descreveram a primeira demonstração da presença da calicreína tecidual no coração do rato. A enzima cardíaca foi isolada dos extratos do coração de ratos e mostrou ser serino protease ativa. A enzima mostrou-se indistinguível da calicreína tecidual e, claramente, distinta de outros membros da família da calicreína, com relação à massa molecular, carga elétrica, propriedades imunológicas, pH ótimo, especificidades pelo substrato e susceptibilidade por inibidores. Determinações da calicreína tecidual de ratos foram realizadas por radioimunensaio direto, apresentando um baixo conteúdo de calicreína tecidual cardíaca (0,35 ng/mg de proteínas) quando comparado com o rim (36,1 ng/mg de

proteínas) ou outros tecidos. Outros estudos também relatam a baixa expressão da calicreína no tecido cardíaco. Métodos mais sensíveis, como Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) detectaram mRNA de calicreína tecidual no átrio e ventrículo, como também, em culturas de cardiomiócitos (WU *et al.*, 2004).

Além do efeito vasopressor, a calicreína tecidual tem mostrado efeitos cardioprotetores. A aparente função local da calicreína tecidual no coração é respaldada por estudos em camundongos deficientes de calicreína, os quais desenvolvem problemas cardíacos. Análises histológicas sugerem que a calicreína não é necessária para o desenvolvimento das estruturas cardíacas, mas tem um papel na manutenção das funções dos cardiomiócitos. Um provável mecanismo seria de que a calicreína age de forma localizada para gerar fator de crescimento que é necessário na manutenção das funções dos cardiomiócitos. (WU *et al.*, 2004).

Estudos mostram que a bradicinina, mesmo em concentrações tão baixas como 1 nM, é capaz de aumentar o fluxo coronário e reduzir a incidência e duração da fibrilação ventricular (SCHOLKENS & LINS, 1989)

A calicreína tecidual, que produz cininas a partir de cininogênios, pode ser um fator importante na regulação deste sistema. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel da calicreína tecidual cardíaca, especialmente em condições de doenças cardíacas isquêmicas. (XIONG *et al.*, 1990)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aprofundar os conhecimentos sobre a caracterização cinética da calicreína tecidual do rato isolada do coração e comparar os resultados com dados relativos publicados na literatura para a calicreína tecidual humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair a calicreína tecidual do rato a partir do pó liofilizado do coração utilizando processos de extração diferentes, visando otimizar a extração da enzima.
- Extrair a calicreína tecidual do rato a partir do pó liofilizado do rim, da glândula submandibular e do pó urinário utilizando processos já descritos na literatura.
- Determinar as atividades amidásicas da calicreína tecidual do rato com os substratos Bz-Arg-Nan e D-Val-Leu-Arg-Nan nos diferentes extratos.
- Determinar as concentrações de proteínas nos diferentes extratos.
- Calcular as atividades amidásicas específicas da calicreína tecidual nos diferentes extratos.
- Comparar as atividades amidásicas específicas da calicreína tecidual do rato presente no extrato do coração com as atividades amidásicas específicas da

calicreína tecidual presente nos extratos renal, de glândulas submandibulares e do pó urinário do rato para verificar se o processo de extração foi eficiente.

- Se for eficiente, purificar a calicreína tecidual presente no pó de coração do rato, e caracterizá-la.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra

A amostra utilizada foi o pó liofilizado resultante de 150 corações de ratos Wistar adultos (75 a 115 g) criados no Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. Em 1997 os ratos foram anestesiados com 0,1 mL de tiopental (1 g/100 mL), para cada 100 g de peso do rato e retiradas as glândulas submandibulares, os rins e os corações. Os órgãos foram colocados em béqueres separados contendo salina e mantidos em banho de gelo. Os órgãos foram comprimidos entre papel absorvente para eliminação do sangue e da salina residuais e armazenados a -20°C. A seguir, os rins e os corações foram descongelados e triturados em multiprocessador (Arno). As massas resultantes foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Os pós resultantes foram estocados em geladeira até o início da execução deste trabalho.

3.1.1 Preparação da amostra

Os pós liofilizados de coração e de rim foram deixados fora da geladeira até alcançar a temperatura ambiente e desengordurados. Para o desengorduramento, cada pó foi misturado e macerado em graal com éter etílico. A mistura foi transferida para um béquer, o volume completado para 500 mL com éter, agitado em agitador magnético mantido em geladeira por 30 minutos e filtrado em papel de filtro qualitativo com auxílio de bomba a vácuo. Este procedimento foi realizado duas vezes para assegurar um melhor desengorduramento. O material retido no papel de filtro foi distribuído em placas de Petri, tampadas com filme de PVC, perfurado com agulha, e estas foram deixadas durante 18 horas à temperatura ambiente para evaporação completa do éter. O pó de coração e o pó renal obtidos deste processo foram pesados

em balança analítica (7,4 g e 15,1 g; respectivamente). Os pós foram armazenados em frascos hermeticamente fechados entre 2 e 8°C até o momento de uso.

3.2 Preparação dos extratos

Para obtenção dos extratos descritos a seguir, os pós foram pesados em balança analítica de acordo com as concentrações especificadas, macerados com um pequeno volume dos respectivos tampões, cerca de 10 min e o volume foi completado para o valor final com o tampão. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a 6°C. O sobrenadante foi então, filtrado em filtro Millipore poro 0,45 µm.

A – Pó de coração de rato

- 1) Extrato de pó de coração a 0,25 mg/mL em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0
- 2) Extrato de pó de coração a 2 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0
- 3) Extrato de pó de coração a 2 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol
- 4) Extrato de pó de coração a 2 mg/mL em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0
- 5) Extrato de pó de coração a 2 mg/mL em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 30% de 2-metoxietanol
- 6) Extrato de pó de coração a 2 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0
- 7) Extrato de coração a 2 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol
- 8) Extrato de pó de coração a 5 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1

- 9) Extrato de pó de coração a 20 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1
- 10) Extrato de pó de coração a 50 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1
- 11) Extrato de pó de coração a 50 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 30% de 2-metoxietanol

O extrato A-11 (extrato de pó de coração a 50 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 30% de 2-metoxietanol) foi agitado em agitador magnético cerca de 18 h entre 2 e 8 °C e submetido ao ultra-som durante 1 h, antes das etapas de centrifugação e filtração, como descrito acima.

B – Pó renal de rato

- 1) Extrato de pó de rim a 2 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0
- 2) Extrato de pó de rim a 2 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol
- 3) Extrato de pó de rim a 20 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1

O extrato B-2 (extrato de pó de rim a 2 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol) foi agitado em agitador magnético durante 30 min entre 2 e 8°C e submetido ao ultra-som durante 30 min. Após estes procedimentos, o extrato foi centrifugado e filtrado, como descrito acima.

C – Glândula submandibular do rato

Extrato de pó de glândula submandibular a 0,05 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol.

D – Pó urinário

Extrato de pó urinário (armazenado congelado no laboratório) a 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0.

3.3 Material e equipamentos

- Ácido acético glacial (Synth[®], Brasil)
- Ácido clorídrico (Synth[®], Brasil)
- Ácido fosfórico a 85% (v/v) (Merck[®], Brasil)
- Álcool etílico 96% (v/v) (Synth[®], Brasil)
- Azida sódica (Sigma[®], USA)
- β -tripsina bovina (fornecida pelo Prof. Dr. Marcelo M. Santoro – Depto de Bioquímica e Imunologia do ICB – UFMG)
- Blue G 250 (Riedel-de-Haën[®], Alemaha) (Azul brilhante de Coomassie)
- Bovine serum albumin (BSA) (Sigma[®], USA)
- Cloreto de cálcio (Merck[®], Brasil)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck[®], Brasil)
- Éter etílico (Vetec[®], Brasil)
- Fosfato de sódio (Merck[®], Brasil)
- Glicina (Sigma[®], USA)
- H-D-valil-L-leucil-L-arginina 4-nitroanilida (D-Val-Leu-Arg-Nan) (PM = 579,6) (Chromogenix[®], Itália)
- Hidróxido de sódio (Synth[®], Brasil)
- 2-metoxietanol (Aldrich, USA)
- N α -benzoil L-arginina 4-nitroanilida (Bz-Arg-Nan) (Sigma[®], USA)

- Papel de filtro qualitativo
- SBTI (Soybean trypsin inhibitor) (Sigma[®], USA)
- Trasylol[®] (Bayer[®], Brasil)
- Agitador magnético Mod. 257 (Fanem, Brasil)
- Balança analítica Mod. AG 204 (Mettler Toledo, Suíça)
- Banho-maria com controlador microprocessado Mod.116 B (Unitemp[®], Brasil)
- Bomba a vácuo Mod. WP6111560 (Unique)
- Centrífuga Mod. MR 1812 (Jouan, França)
- Deionizador de água Milli-Q (Millipore[®] - USA)
- Espectrofotômetro UV – 160 A (Shimadzu[®], Japão)
- Liofilizador (Mod L4KR – Edwards)
- Potenciômetro Micronal[®] B 374
- Ultra-som (Mod. Maxi Clean 1400, Unique)

3.4 Métodos

3.4.1 Determinação da Concentração de Proteínas

As determinações da concentração de proteínas nos extratos foram realizadas pelos métodos de Bradford (1976) e Peterson (1983), utilizando-se a BSA como padrão, como descrito por Sousa (1993). O princípio do método de Bradford baseia-se na ligação da proteína ao corante azul brilhante de Coomassie. A ligação da proteína ao corante altera a absorvância máxima do corante de 465 nm para 595 nm, sendo a absorvância da mistura de incubação monitorada em 595 nm.

O reagente de cor foi preparado dissolvendo-se 25 mg de azul brilhante de Coomassie® em 12,5 mL de etanol a 95% (v/v), adicionando-se a esta solução 25 mL de ácido fosfórico a 85% (v/v). A solução resultante foi diluída para um volume final de 250 mL com água Milli-Q. Esta solução foi armazenada entre 2 e 8°C e filtrada em papel de filtro qualitativo no momento de uso.

Como padrão protéico foi utilizada a solução estoque de BSA, já descrita. A partir desta solução, foram preparados três padrões de concentrações 0,010 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0,050 mg/mL, em um volume final de 0,5 mL do mesmo tampão utilizado para preparar o extrato.

3.4.2 Preparação do padrão de albumina de soro bovino (BSA) 0,5 mg/mL

A solução padrão estoque de albumina de soro bovino (BSA) foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL em água Milli-Q (água tipo I) contendo 0,01 % (p/v) de azida sódica. A absorvância da solução padrão de albumina foi lida a 280 nm para a determinação da sua concentração real. Esta foi calculada utilizando-se a equação:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Onde,

A = absorvância da solução em 280 nm

a = absortividade = $0,7693 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$b = 1 \text{ cm}$ (caminho óptico)

$c =$ concentração real da solução de BSA (mg/mL)

A solução foi distribuída em alíquotas de 1 mL, em microtubos tipo Eppendorf, e armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

As misturas foram incubadas em quadruplicatas à temperatura ambiente durante 10 min, conforme o quadro 1:

Quadro 1

Tubos	B	P ₁	P ₂	P ₃	A	CA
Reagentes						
Tampão (mL)	0,5	-	-	-	-	2,0
Padrão 1 (mL)	-	0,5	-	-	-	-
Padrão 2 (mL)	-	-	0,5	-	-	-
Padrão 3 (mL)	-	-	-	0,5	-	-
Amostra (mL)	-	-	-	-	0,5	0,5
Reagente de cor (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-

Onde: B = branco; P₁ = padrão 1 a 0,010 mg/mL; P₂ = padrão 2 a 0,025 mg/mL;

P₃ = padrão a 0,050 mg/mL; A = amostra; CA = controle da amostra.

O espectrofotômetro foi zerado com o tampão utilizado na reação, para proceder a leitura da absorvância do controle da amostra, e foi zerado com o branco (B),

conforme descrito no quadro acima, para proceder as leituras de absorvância dos padrões e da amostra. Na célula de referência ficava o tampão ou o branco.

A concentração em mg/mL de proteínas da amostra foi calculada a partir das absorvâncias obtidas, conforme equação abaixo, descrita por Peterson (1983).

$$P = b \cdot A (1 - a \cdot A)^{-1}$$

Sendo:

$$a = A^{-1} - b \cdot P^{-1}$$

$$b = (A_1^{-1} - A_2^{-1}) / (P_1^{-1} - P_2^{-1})$$

$$A^{-1} = (A_1^{-1} + A_2^{-1}) / 2$$

$$P^{-1} = (P_1^{-1} + P_2^{-1}) / 2$$

Onde:

P = concentração em proteínas na amostra

A = absorvância da amostra

A₁ = absorvância do padrão de menor concentração

A₂ = absorvância do padrão de maior concentração

P_1 = concentração do padrão de menor concentração (mg/mL)

P_2 = concentração do padrão de maior concentração (mg/mL)

Para os cálculos, foram selecionados dois dos padrões, cujos valores de absorvância eram mais próximos, sendo um menor e outro maior do que os valores de absorvância da amostra.

3.4.3 Determinação da atividade amidásica da calicreína tecidual do rato (rK1)

A atividade amidásica da rK1 era determinada utilizando-se o substrato Bz-Arg-Nan, como descrito por Sousa (1993). A solução estoque do Bz-Arg-Nan foi preparada dissolvendo-se 196 mg do substrato em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) resultando em uma solução a 90,16 mM. Esta solução foi distribuída em alíquotas, e estas foram armazenadas a -20 °C. Para ser utilizada na incubação, era realizada uma diluição da solução estoque a 1 : 100 em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 0,01 % (p/v) de azida sódica.

A reação era realizada em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 0,01 % de azida sódica a 37 °C durante 30 min. A reação era iniciada adicionando-se a solução do substrato à amostra e à amostra + Trasylol 1000 KIU/mL (inibidor de calicreínas), todos equilibrados a 37 °C. Controles da amostra sem substrato e do substrato sem amostra eram incubados nas mesmas condições. Após 30 min de incubação, a reação era paralisada pela adição de ácido acético a 60% (v/v).

As incubações eram realizadas em quadruplicatas. A amostra e os reagentes eram adicionados conforme o quadro 2:

Quadro 2

Tubos	CS	CA	A	A+T
Reagentes				
Tampão (µL)	200	500	100	-
Amostra (µL)	-	100	100	100
Trasylol (µL)	-	-	-	100
Incubar 10 minutos a 37° C				
Substrato (µL)	400	-	400	400
Incubar 30 minutos a 37° C				
Ácido acético a 60% (µL)	100	100	100	100

Onde: CS = controle do substrato Bz-Arg-Nan; CA = controle da amostra; A = amostra e A+T = amostra + Trasylol.

Para zerar o espectrofotômetro era utilizado o tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 0,01 % de azida sódica.

A reação enzimática era monitorada pela leitura das absorvâncias em 410 nm da 4-nitroanilina liberada ($\epsilon_{410} = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (ERLANGER *et al.*, 1961). O valor da absorvância foi convertido em velocidade expressa em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, utilizando-se a seguinte equação:

$$v = \frac{\Delta A_{410} \times 1,17 \times 10}{8.800 \times 30}$$

Onde,

v = velocidade da reação

ΔA_{410} = leitura das absorvâncias em 410 nm das misturas de incubação, contendo o substrato e a amostra, menos a leitura da misturas de incubação, contendo o substrato, o Trasylol[®] e a amostra.

1,17 = fator de correção para o volume (volume da mistura, cuja absorvância foi lida, dividido pelo volume da mistura de incubação, ou seja, 700 μL / 600 μL)

8.800 = absortividade molar da 4-nitroanilina

30 = tempo de incubação em min

10 = fator para a conversão de 100 μL para 1 mL

A atividade amidásica da rK1 era dividida pela concentração de proteínas na amostra e expressa como atividade amidásica específica em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

3.4.4 Ativação da pré-caliceína tecidual nos extratos dos pós renal e de coração do rato com a β -tripsina bovina

A ativação da pré-caliceína, possivelmente presente no extrato de pó do coração e presente no pó renal era realizada incubando-se a solução de β -tripsina bovina a 0,5 mg/mL em HCl 10^{-3} M durante 30 e 60 min a 37°C, de acordo com

Nishimura *et al.*, 1983. Foram utilizados extratos de pó de coração nas concentrações de 5 mg/mL, 20 mg/mL e 50 mg/mL, nos tampões Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 e Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM contendo 30% de 2-metoxietanol, ambos contendo 0,01 % de azida sódica. Nos extratos de pó renal as concentrações foram de 2 mg/mL e 20 mg/mL nos tampões Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 e Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20mM, pH 8,1 contendo 30% de 2-metoxietanol, ambos contendo 0,01 % de azida sódica. As misturas dos extratos com a β -tripsina eram incubadas durante 30 min a 37 °C. As reações eram paralisadas adicionando-se solução de SBTI a 1 mg/mL em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 0,01 % de azida sódica. Eram incubados, também, controles para a ativação, para a inibição da β -tripsina pelo SBTI e para avaliar a atividade da β -tripsina. A incubação para o controle da inibição da β -tripsina pelo SBTI continha o tampão, a β -tripsina e o SBTI. A incubação para avaliar a atividade da β -tripsina continha apenas o tampão e a β -tripsina.

Segue abaixo quadro 3 de procedimento da ativação da pré-caliceína:

Quadro 3

Tubos	APC	CAT	CI	CT
Reagentes				
Amostra (µL)	1880	1880	-	-
Tampão (µL)	80	100	1960	1980
B-Tripsina (µL)	20	-	20	20
Incubar 30 minutos a 37 °C				
SBTI (µL)	20	20	20	-

Onde: *APC* = ativação da pré-caliceína; *CAT* = controle da ativação; *CI* = controle da inibição da β -tripsina pelo SBTI e *CT* = controle da atividade da β -tripsina

Das misturas resultantes eram retiradas amostras que eram incubadas com os substratos o Bz-Arg-Nan e o D-Val-Leu-Arg-Nan, para a verificação da possível ativação da pré-caliceína tecidual do rato em caliceína.

3.4.5 Determinação da atividade amidásica da caliceína tecidual do rato após ativação da pré-caliceína pela β -tripsina

Nas experiências de ativação da pré-caliceína nos extratos de pó renal e de pó de coração foram utilizados como substratos, o Bz-Arg-Nan e o D-Val-Leu-Arg-Nan, como descrito por Yamada e Erdős (1982). O substrato D-Val-Leu-Arg-Nan denominado comercialmente como S-2266TM, liofilizado (frasco contendo 25 mg) foi

reconstituído em 4,313 mL de água Mili-Q, sendo obtida assim, uma solução estoque de concentração 0,01 M. Esta solução foi alíquotada e congelada. Para ser utilizada na incubação a solução estoque era diluída em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 0,01 % de azida sódica, dando origem à solução de uso, com concentração de 200 μ M. A reação foi iniciada adicionando-se a solução do substrato em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 0,01 % de azida sódica à solução da amostra (extrato bruto + β -tripsina + SBTI) em tampão Tris-HCl Ca^{+2} 0,1 M, pH 8,1 contendo 0,01 % de azida sódica, ambas equilibradas a 37 °C. Controles da amostra sem o substrato e do substrato sem a amostra, da ativação da pré-caliceína, da inibição e da atividade da β -tripsina bovina eram incubados nas mesmas condições. Após 30 min de incubação, a reação era paralisada pela adição de ácido acético a 60% (v/v).

As incubações eram realizadas em quadruplicatas. A amostra e os reagentes eram adicionados conforme o quadro 4:

Quadro 4

Tubos	CS	CA	APC	CAT	CI	CT
Reagentes						
Tampão (µL)	200	500	100	100	100	100
APC (µL)	-	100	100	-	-	-
CAT (µL)	-	-	-	100	-	-
CI (µL)	-	-	-	-	100	-
CT (µL)	-	-	-	-	-	100
Incubar 10 minutos a 37° C						
Substrato (µL)	400	-	400	400	400	400
Incubar 30 minutos a 37° C						
Ácido acético a 60% (µL)	100	100	100	100	100	100

Onde: CS = controle do substrato (Bz-Arg-Nan ou D-Val-Leu-Arg-Nan);
CA = controle da amostra;

Tubos: APC = ativação da pré-caliceína; CAT = controle da ativação;
CI = controle da inibição da β -tripsina pelo SBTI e CT = controle da atividade da β -tripsina

Reagentes: APC, CAT, CI e CT são as respectivas misturas obtidas da incubação de ativação da pré-caliceína (quadro anterior)

A reação enzimática era monitorada e a atividade amidásica calculada como descrito no item 4.4.3 (Determinação da atividade amidásica da calicreína tecidual do rato); porém, eram utilizadas as A_{410} das misturas de incubação APC e CAT, separadamente, para determinação da atividade amidásica da pré-calicreína e da calicreína, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Teor em proteínas e atividades amidásicas com o substrato Bz-Arg-Nan dos diversos extratos ensaiados.

- 4.1.1 O extrato do pó de coração na concentração de 0,25 mg/mL (m/v) preparado em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 0,01 % de azida sódica, cuja concentração em proteínas foi de 0,036 mg/mL incubado com o substrato Bz-Arg-Nan 90,16 µM a 37 °C durante 30 min não apresentou atividade amidásica.
- 4.1.2 Os extratos do pó de coração na concentração de 2 mg/mL (m/v) preparados em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 e em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol, ambos contendo 0,01 % de azida sódica, cujas concentrações em proteínas foram de 0,180 mg/mL e 0,090 mg/mL, respectivamente, incubados com o mesmo substrato nas mesmas condições acima mencionadas, também não apresentaram atividade amidásica.
- 4.1.3 Os extratos do pó de coração com concentração de 2 mg/mL (m/v) preparados em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0; tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo 30% de 2-metoxietanol; tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol, todos contendo 0,01 % de azida sódica, foram primeiramente incubados com o substrato Bz-Arg-Nan nas mesmas condições citadas acima e não apresentaram atividade amidásica. Por isso, não foram submetidos a determinação da concentração de proteínas.
- 4.1.4 No extrato de pó de coração a 5 mg/mL (m/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 0,01 % de azida sódica, concentração em proteínas de 0,300 mg/mL, não foi observada atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-

Nan, incubado nas mesmas condições dos extratos anteriores. Este extrato foi tratado com a β -tripsina bovina durante 30 e 60 min de incubação a 37 °C e posteriormente, incubado com o substrato Bz-Arg-Nan, nas mesmas condições e não apresentou atividade amidásica.

4.2 Teor em proteínas e atividades amidásicas dos extratos tratados e não tratados com β -tripsina bovina com o substrato Bz-Arg-Nan.

As concentrações dos extratos de pó de coração, em m/v e em proteínas, tratados e não tratados com a β -tripsina bovina e suas atividades amidásicas específicas com o substrato Bz-Arg-Nan estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações em m/v e em proteínas dos extratos de pó de coração e atividades amidásicas específicas com Bz-Arg-Nan

Extratos pó de coração (mg/mL) ^a (m/v)	Proteínas (mg/mL)	Atividades amidásicas específicas ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	
		Sem tratamento com a β -tripsina	Após tratamento com a β -tripsina
20	1,4	0,57	0,47
50	3,3	0,98	0,84

a = extrato preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M, Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 0,01 % de azida sódica

4.3 Teor em proteínas e atividades amidásicas dos extratos tratados e não tratados com β -tripsina bovina com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan.

As concentrações dos extratos, em m/v e em proteínas, tratados e não tratados com a β -tripsina bovina, preparados nos tampões Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 e Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 30% de 2-metoxietanol, ambos contendo 0,01 % de azida sódica e as respectivas atividades amidásicas e amidásicas específicas, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações em m/v e em proteínas dos extratos de pó de coração e atividades amidásicas específicas com D-Val-Leu-Arg-Nan

Extratos de pó de coração (mg/mL) (m/v)	Proteínas (mg/mL)	Atividades amidásicas	
		Sem tratamento com a β -tripsina ^c	Após tratamento com a β -tripsina ^c
50 ^a	3,5	3,28 ^d	6,25 ^d
		0,94 ^e	1,78 ^e
50 ^b	1,3	3,94 ^d	6,56 ^d
		3,00 ^e	4,97 ^e

a = extrato preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 (m/v), submetido à maceração durante 10 min com bastão de vidro

b = extrato preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 30% de 2-metoxietanol (m/v), com agitação durante 18 h, sob refrigeração entre 2 e 8 °C e em seguida, submetido ao ultra-som durante 1 h.

c = pré-incubação em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1

d = atividade amidásica ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)

e = atividade amidásica específica ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

4.4 Atividades amidásicas dos extratos de pó renal.

4.4.1 Os extratos de pó renal a 2 mg/mL (m/v) em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 e em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol, ambos contendo 0,01 % de azida sódica, incubados com o substrato Bz-Arg-Nan a 37 °C durante 30 min não apresentaram atividade amidásica.

4.4.2 O extrato de pó renal a 20 mg/mL (m/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 0,01 % de azida sódica; cuja concentração em proteínas foi de 1,8 mg/mL, inicialmente incubado com β -tripsina bovina a 37°C durante 5, 15 e 30 min e, posteriormente, incubado com o substrato Bz-Arg-Nan apresentaram as seguintes atividades amidásicas específicas:

0,42 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; 0,74 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e 1,21 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente.

4.5 Comparação das atividades amidásicas dos extratos dos pós de coração, rim, glândulas submandibulares e urina.

Os resultados das determinações de proteínas e das atividades amidásicas do extratos dos pós de coração, rim, glândula submandibular e urinário de rato com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Atividades amidásicas dos extratos dos pós de coração, rim, glândula submandibular e do pó urinário de rato com D-Val- \Rightarrow Leu-Arg-Nan

Extratos		Proteínas (mg/mL)	Atividades amidásicas		
Órgão	Concentração em mg/mL (m/v)		Sem tratamento com a β -tripsina ^f	Após tratamento com a β -tripsina ^f	Sem Pré-incu- bação
Coração	50 ^a	3,5	3,28 ^g 0,94 ^h	6,25 ^g 1,78 ^h	-
	50 ^b	1,3	3,94 ^g 3,00 ^h	6,56 ^g 4,97 ^h	-
Rim	2 ^a	0,15	4,56 ^g 31,25 ^h	6,56 ^g 44,91 ^h	-
	2 ^c	0,14	-	-	3,68 ^g 26,47 ^h
	2 ^d	0,063	4,52 ^g 71,84 ^h	5,85 ^g 93,00 ^h	-
Glândula Submandibular	0,05 ^e	3,30	14530,00 ^g 4403,00 ^h	15060,00 ^g 4563,00 ^h	-
Pó urinário	1 ^c	0,14	-	-	563,00 ^g 4176,00 ^h

a = extrato preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca⁺² 20 mM, pH 8,1 (m/v), submetido à maceração durante 10 min com bastão de vidro

b = extrato preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 30% de 2-metoxietanol (m/v), com agitação durante 18 h, sob refrigeração entre 2 e 8 °C e em seguida, submetido ao ultra-som durante 1 h.

c = extrato preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 (m/v)

d = extrato preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1 contendo 30% de 2-metoxietanol (m/v), com agitação durante 30 min, sob refrigeração entre 2 e 8 °C e em seguida, submetido ao Ultra-som durante 30 min.

e = extrato preparado em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 30% de 2-metoxietanol (m/v)

f = pré-incubação em tampão Tris-HCl 0,1 M Ca^{+2} 20 mM, pH 8,1

g = atividade amidásica ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$)

h = atividade amidásica específica ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

5 DISCUSSÃO

Os extratos de pó de coração a 0,25 mg/mL, 2 mg/mL e 5 mg/mL, todos em m/v, preparados nos diferentes tampões não apresentaram atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan.

Os extratos de pó de coração a 20 mg/mL e 50 mg/mL, em m/v e, 1,4 e 3,3 mg/mL em proteínas, respectivamente, apresentaram uma pequena atividade amidásica específica com o substrato Bz-Arg-Nan. Como o pré-tratamento destes extratos com a β -tripsina bovina (tabela 1) não mostrou aumento na atividade amidásica, após incubação com o mesmo substrato, pode-se concluir que provavelmente eles tenham a pré-caliceína em quantidades não detectáveis.

Os extratos de pó renal a 2 mg/mL (m/v) não apresentaram atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan. Porém, o extrato de pó renal a 20 mg/mL apresentou uma pequena atividade amidásica específica com este substrato. Quando o extrato de pó renal, na concentração de 2 mg/mL (m/v) foi analisado com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, observou-se uma atividade amidásica específica significativamente maior. Este resultado confirma dados da literatura que mostram que o D-Val-Leu-Arg-Nan é um melhor substrato para a caliceína tecidual do rato do que o Bz-Arg-Nan (SOUSA *et al.*, 1996).

Extratos de coração a 50 mg/mL (m/v) foram, então, analisados com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan e apresentaram atividade amidásica específica maior do que a observada nos extratos de mesma concentração em m/v; como também, apresentaram um aumento da atividade amidásica específica após tratamento com a β -tripsina bovina, o que não foi observado com o substrato Bz-Arg-Nan. Com base nestes resultados, pode-se concluir que os extratos de pó de coração tenham a pré-caliceína, em

quantidades tão pequenas que não pode ser detectada com o substrato Bz-Arg-Nan, mas que foi detectada com o melhor substrato D-Val-Leu-Arg-Nan.

Mesmo obtendo resultados melhores com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, as atividades ainda foram muito baixas, não justificando a purificação da calicreína tecidual a partir do coração do rato, com o objetivo de caracterizá-la.

A atividade amidásica específica dos extratos de pó de coração é significativamente mais baixa do que as atividades amidásicas específicas dos extratos dos pós renal, de glândula submandibular e urinário de rato. (tabela 3).

A ativação da pré-calicreína, sabidamente presente no extrato do pó renal, pelo tratamento com a β -tripsina bovina, permitiu validar os ensaios, realizados nas mesmas condições, para a ativação da pré-calicreína, possivelmente presente, no extrato do pó de coração.

Os tempos de incubação 5, 15 e 30 min, do extrato de pó renal com a β -tripsina bovina, foram avaliados com o objetivo de se determinar o tempo de incubação adequado para a ativação da pré-calicreína no extrato de pó de coração. Os resultados obtidos mostraram um aumento nas atividades amidásicas específicas ($0,42 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; $0,74 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e $1,21 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) em função do aumento do tempo do pré-tratamento com a β -tripsina. Por isso, foi escolhido o tempo de 30 min para a pré-incubação do extrato de pó de coração com a β -tripsina.

A preparação dos extratos brutos com tampão contendo 2-metoxietanol, que desorganiza a membrana celular e, conseqüentemente, aumentaria a extração da calicreína, que é uma enzima de membrana, não mostrou aumento nas atividades amidásicas (tabelas 2 e 3). A agitação prolongada em agitador magnético e o tratamento com ultra-som na preparação dos extratos, também, não resultaram em aumento da extração da calicreína tecidual do rato. Estes resultados suportam a hipótese de que há muito pouca calicreína tecidual no coração do rato.

As determinações da concentração de proteínas nos extratos contendo 2-metoxietanol mostraram uma redução no teor de proteínas, que nos leva a concluir que o 2-metoxietanol interfere na metodologia. (tabelas 2 e 3). A atividade específica ficou aumentada uma vez que, esta é a razão entre atividade amidásica e a concentração da proteína. Esta interferência foi confirmada realizando-se o ensaio de determinação de proteínas nos padrões de albumina de soro bovino nas diferentes concentrações com e sem o 2-metoxietanol. Neste caso, o 2-metoxietanol aumentou o valor das absorvâncias da albumina nos padrões.

A análise dos resultados indica que o coração não é uma boa fonte para se extrair e purificar a calicreína tecidual do rato, o que comprova a baixa concentração desta enzima no tecido cardíaco.

6 CONCLUSÃO

O pó de coração de rato apresentou uma quantidade de calicreína tecidual muito pequena, não justificando a continuação do trabalho de isolamento e purificação da enzima para a caracterização cinética, como fora programado no projeto de pesquisa.

β -TRIPSINA BOVINA

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRIPSINA

Tripsinogênios foram, primeiro, pensados ser enzimas pancreáticas unicamente envolvidas no processo digestivo, mas na década de 80, foi identificada uma protease semelhante à tripsina na membrana de células cancerígenas (LABOMBARDI *et al.*, 1983)

Os tripsinogênios latentes necessitam ser ativados nas, cataliticamente competentes, tripsinas. No trato digestivo, os tripsinogênios secretados são ativados pela serino protease enteroquinase / enteropeptidase (LU *et al.*, 1999).

O tripsinogênio e sua forma ativa, tripsina, foi uma das primeiras enzimas a ser isolada e caracterizada. Ela foi cristalizada do pâncreas humano em 1936 (KUNITZ *et al.*, 1936).

A tripsina (EC 3.4.4.4) é uma das serino proteases mais bem estudadas e caracterizadas; por isso, é uma das enzimas melhor compreendidas em termos estruturais, de sua especificidade e do seu mecanismo catalítico. Em virtude disso, a tripsina é uma enzima utilizada como modelo experimental para estudos de caracterização de outras serino proteases.

A tripsina é uma enzima proteolítica e com uma ampla especificidade com relação ao substrato. O seu centro ativo é constituído de um sítio aniônico, ao qual ligam-se substratos e inibidores, carregados positivamente; um sítio hidrofóbico, adjacente ao sítio aniônico, ao qual ligam-se substratos e inibidores, por suas cadeias hidrocarbonadas, e o sítio catalítico propriamente dito, que é constituído da tríade catalítica His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ e Asp¹⁰² (MARES-GUIA *et al.*, 1965). Ela catalisa a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo a carboxila terminal dos aminoácidos Arg e Lis nas proteínas (CRAIK *et al.*, 1985). Ela catalisa, também, a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo os aminoácidos L-arginina e L-lisina em substratos sintéticos dos tipos

amida e éster derivados da arginina e lisina N- α -substituídas, tais como: N- α -benzoil-L-arginina 4-nitroanilida (Bz-Arg-Nan) (MARES-GUIA & FIGUEIREDO, 1970), D-valil-L-leucil-L-arginina 4-nitroanilida (D-Val-Leu-Arg-Nan) (INAGAMI *et al.*, 1964), N- α -benzoil-L-arginina etil éster (Bz-Arg-OEt) (Oliveira *et al.*, 1993), e N- α -p-toluenosulfonil-L-arginina metil éster (Tos-Arg-OMe) (MAGALHÃES-ROCHA, ROGANA & MARES-GUIA, 1979).

Muitos dos trabalhos de pesquisa realizados com a tripsina utilizaram e, ainda utilizam substratos sintéticos como o Bz-L-Arg-Nan e o D-Val-Leu-Arg-Nan. A hidrólise da ligação peptídica Arg-Nan nestes substratos resulta em dois produtos, Bz-L-Arg-COOH e a 4-nitroanilina (4-NAn) e D-Val-Leu-Arg-COOH e a 4-NAn, respectivamente.

A tripsina é inibida por inibidores naturais que se ligam ao seu sítio ativo por meio de uma Arg ou Lis, semelhantemente à ligação de um substrato natural. Dentre tais inibidores podem-se citar a aprotinina, também conhecida como inibidor básico pancreático de tripsina (BPTI) e o inibidor de tripsina isolado de soja (SBTI) (SCHACHTER *et al.*, 1980). Segundo Vogel e Werle (1970), no BPTI, a lisina 15 participa da formação do complexo enzima-inibidor.

Em 1965, Mares-Guia e Shaw relataram que as amidinas e as guanidinas são inibidores competitivos da tripsina, sendo a p-aminobenzamidina e a benzamidina os melhores inibidores (MARES-GUIA & SHAW, 1965). A partir daí, um grande número de inibidores sintéticos da tripsina e de outras serino proteases têm sido preparados derivados da benzamidina e da p-aminobenzamidina. Esta é conhecida como sendo, provavelmente, a pequena molécula mais potente como inibidor de serino proteases (TALHOUT & ENGBERTS, 2001).

Várias linhas de evidências têm sugerido que a tripsina tem um segundo sítio de ligação do substrato, isto é, um sítio de ativação pelo substrato, próximo ao centro

ativo, mas não nele. Dados cinéticos publicados indicaram a formação de complexos binários e ternários entre a enzima, o substrato e o modificador, que também poderia ser o substrato com os complexos ternários decompondo-se em produtos em uma velocidade mais alta do que os complexos binários (TROWBRIDGE *et al.*, 1963).

Estudos cristalográficos do complexo tripsina-BPTI, identificaram uma região de contato muito próxima ao centro ativo da enzima, onde o resíduo Arg-17 do inibidor interage fortemente e especificamente, por meio do seu grupo guanidino com a Tyr-39 e Tyr-151 da tripsina (numeração de acordo com resíduos homólogos do quimotripsinogênio) (RÜHLMAM *et al.*, 1973).

Note que o resíduo ativo do BPTI é o grupo $\epsilon\text{-NH}_3^+$ da Lis-15, que interage com o grupo COO^- do Asp-17, o sítio aniônico da tripsina (VOGEL & WERLE, 1970). Foi demonstrado que a Tyr-151 participa do mecanismo de ativação da tripsina pelo substrato e que, de fato, o sítio secundário está diretamente relacionado ao mecanismo de ativação, como indicado pelo achado que a azo- β -tripsina modificada na Tyr-151 tinha duas vezes a atividade da enzima nativa (OLIVEIRA *et al.*, 1993).

A inibição competitiva da tripsina por amidinas e guanidinas foi demonstrada por Mares-Guia e Shaw (1965). Baseado em dados da literatura e nos seus resultados, os autores propuseram que o sítio de especificidade da tripsina é composto por um sítio aniônico, ao qual substratos ou inibidores ligam-se eletrostaticamente, por meio de sua carga positiva, e um sítio de ligação hidrofóbica localizado em linha com, e entre, os sítios aniônico e catalítico, na forma de uma fenda que liga-se à cadeia hidrocarbonada lateral dos substratos ou dos inibidores (MARES-GUIA & SHAW, 1965).

Bis-benzamidinas, drogas que têm atividades tripanossomicidas, antiviral e citotóxica foram mostradas inibir competitivamente a tripsina e serino proteases semelhantes à tripsina, que são fisiologicamente importantes (JUNQUEIRA *et al.*, 1992).

Estudos de ligação de equilíbrio demonstraram que a tripsina liga-se simultaneamente a duas moléculas de 4-4'-diazamino-bis-benzamidina (DABB), também conhecida como berenil, quando as concentrações do inibidor aproximam-se da faixa milimolar: uma molécula no sítio ativo e a outra em um sítio de ligação secundário (ANDRADE, 1990).

A inibição competitiva parabólica, um raro tipo de inibição de enzimas de um único substrato, foi descrita para α e β - tripsina bovinas pelo DABB. Assim, por experiências cinéticas, foi demonstrado que a DABB é reconhecida por dois diferentes sítios, um é o sítio ativo e o outro é o sítio de ligação secundário (JUNQUEIRA, *et al.*, 1992).

Estudos realizados no nosso laboratório mostraram que a calicreína tecidual humana (hk1), uma serino protease semelhante à tripsina é inibida pela benzamidina, p-benzamidina e 4-nitroanilina. Embora a inibição da hk1 pelas amidinas seja competitiva linear, a sua inibição pela 4-nitroanilina é linear mista com o inibidor sendo capaz de ligar-se tanto à enzima livre (E), produzindo um complexo EI, quanto ao complexo enzima-substrato (ES), produzindo um complexo ESI (SOUSA *et al.*, 2001).

Trabalhos recentes sugerem que a tripsina e seu receptor específico (receptor 2 de protease ativada- PAR 2) desempenham um papel importante na produção de citocinas e conseqüentemente, o desenvolvimento de danos em órgão distante durante eventos como a pancreatite aguda no rato (MAEDA *et al.*, 2005).

Também, tem sido demonstrado, recentemente, o envolvimento da tripsina na promoção, proliferação, invasão e metástase do câncer colo-retal. A tripsina, uma bem conhecida enzima digestiva pancreática, tem sido encontrada em outros tecidos e vários tipos de câncer, principalmente no câncer colo-retal (SOREIDE *et al.*, 2006).

A β -tripsina bovina tem sido usada, no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, como uma proteína modelo para estudos cinéticos e termodinâmicos por causa de sua bem conhecida

estrutura terciária, quase esférica, determinada por difração de raio-X e, porque seus processos de isolamento e purificação são relativamente fáceis (GÜNTHER, SANTORO & ROGANA, 1997).

O objetivo do presente estudo foi examinar em profundidade a cinética da atividade amidásica da β -TRB pela 4-Nan, um produto da hidrólise dos substratos 4-nitroanilidas, a fim de identificar o mecanismo preciso da inibição, determinar o número de sítios de ligação e suas respectivas constantes de inibição (K_i).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto de pesquisa tem por objetivo geral determinar a atividade amidásica da β -tripsina bovina, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, na ausência e na presença da 4-NAn, analisar e interpretar os resultados.

2.2 –OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar experiências cinéticas da β -tripsina bovina, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, em pH 8,1 a 37°C, na ausência e na presença de diferentes concentrações da 4-NAn.
- Calcular os valores das constantes cinéticas K_M , V_{max} e k_{cat} , para a β -tripsina bovina com este substrato.
- No caso de se observar inibição da enzima pela 4-NAn, caracterizar o tipo de inibição e calcular o valores das constantes de inibição, K_i e K_i' .
- Comparar os resultados obtidos neste estudo, com os resultados já obtidos para a inibição da atividade amidásica da claicreína tecidual humana (hK1), com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, pela 4-NAn.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e equipamentos

- Ácido acético glacial (Synth[®], Brasil)
- Ácido clorídrico (Synth[®], Brasil)
- Azida sódica (Sigma[®], USA)
- β -tripsina bovina (fornecida pelo Prof. Dr. Marcelo M. Santoro – Depto de Bioquímica e Imunologia do ICB – UFMG)
- Cloreto de cálcio (Merck[®], Brasil)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck[®], Brasil)
- H-D-valil-L-leucil-L-arginina 4-nitroanilida (D-Val-Leu-Arg-Nan) (PM = 579,6) (Chromogenix[®], Itália)
- 4-Nitroanilina (Sigma[®], USA)
- Trizma (Sigma[®], USA)
- Papel de filtro qualitativo
- Balança analítica Mod. AG 204 (Mettler Toledo, Suíça)
- Banho-maria Unitemp[®] com controlador microprocessado modelo 116 B
- Deionizador de água Mili-Q (Millipore[®] - USA)
- Espectrofotômetro UV – 160 A (Shimadzu[®], Japão)
- Potenciômetro Micronal[®] B 374

3.2 Obtenção da β -tripsina bovina (β -TRB) purificada

A enzima β -tripsina bovina (β -TRB), para o desenvolvimento deste trabalho, foi purificada no Laboratório de Enzimologia e de Físico-Química de Proteínas (Laboratório Prof. Marcos Luiz dos Mares-Guia) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG e fornecida pelo Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro (SANTOS *et al.*, prelo).

A titulação em centro ativo foi realizada no mesmo laboratório e a enzima fornecida apresentou um teor de 92 % em centro ativo.

3.3 Preparação da solução de uso da β -tripsina bovina

Uma solução estoque de β -TRB (PM 24000) (DIAS *et al.*, 1986) foi preparada dissolvendo-se 2,0 mg da enzima liofilizada em 1,0 mL de solução de HCl 10^{-3} M. A concentração teórica desta solução foi de 83,3 μ M. A concentração real, em proteína, desta solução foi determinada dividindo-se a sua absorvância em 280 nm pelo valor da absorvidade molar (ϵ_{280}) da β -TRB ($37000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (TALHOUT & ENGBERTS, 2001). A concentração real, em centro ativo desta solução foi encontrada multiplicando-se o valor da concentração real, em proteína, pela porcentagem de centro ativo da enzima. Alíquotas de 100 μ L desta solução foram armazenadas congeladas em freezer a -20°C .

Soluções de uso da β -TRB eram preparadas, no dia da experiência, diluindo-se a 1/100 a solução estoque com solução de HCl 10^{-3} M. A solução de uso de β -TRB era

conservada em banho de gelo durante todo o tempo da realização dos ensaios. A solução restante era descartada.

3.4 Preparação das soluções de 4-nitroanilina (4-NAn)

Uma solução estoque de 4-NAn (MM = 138,1) foi preparada dissolvendo-se 11,47 mg em 40 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e completando-se o volume para 50 mL com tampão Tris-HCl, 100 mM, pH 8,1, contendo CaCl_2 20 mM e azida de sódio a 0,1 % (p/v). A concentração teórica desta solução estoque era de 1,66 mM. A concentração real desta solução foi determinada dividindo-se a sua absorvância em 280 nm pelo valor da absortividade molar (ϵ_{280}) da 4-NAn ($8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (ERLANGER, KOKOWSKY & COHEN, 1961).

Para se avaliar o efeito das diversas concentrações da 4-NAn sobre a atividade amidásica da β -TRB, utilizaram-se soluções desta substância com concentrações variando de 0,068 mM a 0,307 mM.

3.5 Métodos

3.5.1 Estudo cinético da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela β -tripsina bovina

A cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β -TRB, na ausência e na presença da 4-NAn, era determinada segundo Sousa *et al.*, (2001).

Para estes ensaios, preparava-se uma solução estoque do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan (10 mM), dissolvendo-se 25 mg em 4,313 mL de água Milli-Q (água tipo I). As soluções de uso do substrato (80 a 960 μ M) eram preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque, em tampão Tris-HCl, 100 mM, pH 8,1, contendo CaCl_2 20 mM e azida de sódio a 0,1% (p/v). A concentração real da solução do substrato era determinada por hidrólise total com solução de β -TRB.

3.5.1.1 Determinação da concentração real do substrato

Para o ensaio de hidrólise total, preparava-se uma solução de uso da β -TRB, diluindo-se a 1/100 a solução estoque (2 mg/mL), preparada como descrito no item 3.3, em solução de HCl 10^{-3} M. Esta solução era mantida em banho de gelo.

Em seguida, a 900 μ L de uma solução 10 mM do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, eram adicionados 100 μ L da solução da β -TRB e as misturas em quadruplicatas, eram incubadas a 37°C, durante quatro horas, quando se obteve uma leitura de A_{410} constante. Neste período, as reações eram paralisadas em intervalos de 30 minutos, adicionando-se 100 μ L de ácido acético a 60%. O controle (branco) continha 100 μ L da solução de HCl 10^{-3} M, em substituição à solução de β -TRB. Após a adição do ácido acético, liam-se as absorvâncias das misturas, em 410 nm, que eram convertidas em concentração real do substrato, dividindo-as pelo valor da absorvidade molar da 4-NAn, que é um dos produtos finais da hidrólise. Dividindo-se o valor da concentração real da solução do substrato, determinada no ensaio, pelo valor da concentração teórica da solução do substrato, obtinha-se um fator. A concentração real da solução estoque do substrato era, então, calculada multiplicando-se o valor de sua concentração teórica pelo fator.

O fundamento da hidrólise do substrato catalisada pela β -TRB é:



3.5.1.2 Cinética da hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β -TRB, na ausência e na presença da 4-Nan

Para se avaliar o efeito das diversas concentrações do substrato, D-Val-Leu-Arg-Nan, sobre a atividade amidásica da β -TRB, utilizaram-se soluções do substrato com concentrações de 80, 120, 160, 320, 480, 640 μM , respectivamente.

As misturas de incubação eram preparadas da seguinte maneira: em uma cubeta de vidro de 1,5 mL, colocada no compartimento da cubeta de referência do espectrofotômetro, eram adicionados 400 μL do tampão Tris-HCl, 100 mM, pH 8,1, contendo CaCl_2 20 mM e azida de sódio a 0,1% (p/v). Em uma outra cubeta de 1,5 mL, colocada no compartimento da cubeta da amostra do espectrofotômetro, eram adicionados 390 μL do tampão Tris-HCl, 100 mM, pH 8,1, contendo CaCl_2 20 mM e azida de sódio a 0,1% (p/v) e 10 μL da solução de uso da β -TRB diluída a 1/100 em $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$. As cubetas eram deixadas nos respectivos compartimentos do espectrofotômetro, termostatizados a 37°C durante 05 min, para equilibrar a temperatura. A seguir, eram adicionados, à cubeta de referência e à cubeta da amostra, 700 μL da solução do substrato, diluída no tampão Tris-HCl, 100 mM, pH 8,1, contendo CaCl_2 20 mM e azida de sódio a 0,1% (p/v). Após a homogeneização rápida da mistura, o espectrofotômetro era acionado para fazer leituras de 15 em 15 segundos durante 3 min no modo cinético.

Nos ensaios cinéticos da inibição da β -TRB pela 4-NAn eram adicionados, à cubeta de amostra, 10 μ L da solução de uso da β -TRB em HCl 10^{-3} M, e volumes crescentes (50, 100, 125, 150, 175, 200 e 225 μ L) de uma solução de uso de 4-Nan, preparada no tampão Tris-HCl, 100 mM, pH 8,1, contendo CaCl_2 20 mM e azida de sódio a 0,1% (p/v), e volumes adequados do mesmo tampão para completar o volume de 400 μ L, para se obter concentrações de 4-NAn, no ensaio, de 0,068; 0,136; 0,170; 0,205; 0,239; 0,273 e 0,307 mM, respectivamente. Na cubeta de referência eram adicionados apenas os volumes da solução da 4-NAn acima mencionados, e os volumes adequados de tampão para completar 400 μ L. As cubetas, com as misturas, eram colocadas nos respectivos compartimentos das cubetas do espectrofotômetro e eram pré-incubadas a 37°C durante 05 min para equilibrar a temperatura. A seguir, eram adicionados à cubeta de referência e à cubeta da amostra 700 μ L da solução de uso do substrato com concentrações variando de 80 a 640 μ M, preparada em tampão Tris-HCl, 100 mM, pH 8,1, contendo CaCl_2 20 mM e azida de sódio a 0,1% (p/v), previamente equilibrada a 37°C. As misturas eram homogeneizadas e as cubetas eram recolocadas nos respectivos compartimentos do espectrofotômetro, termostatizados a 37°C. As incubações eram realizadas em quadruplicatas.

A diferença entre as absorvâncias das misturas de incubação, na cubeta da amostra e na cubeta de referência, era registrada durante 3 min e fornecida como $\Delta A_{410}/\text{min}$. Os valores de $\Delta A_{410}/\text{min}$ eram convertidos em velocidade de reação ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$), utilizando-se a seguinte equação:

$$v = \Delta A_{410} / \text{min} \times 1 / \epsilon M \cdot [\beta\text{-TR}]$$

Onde,

v = velocidade da reação

ΔA_{410} = diferença das absorvâncias em 410 nm por minuto

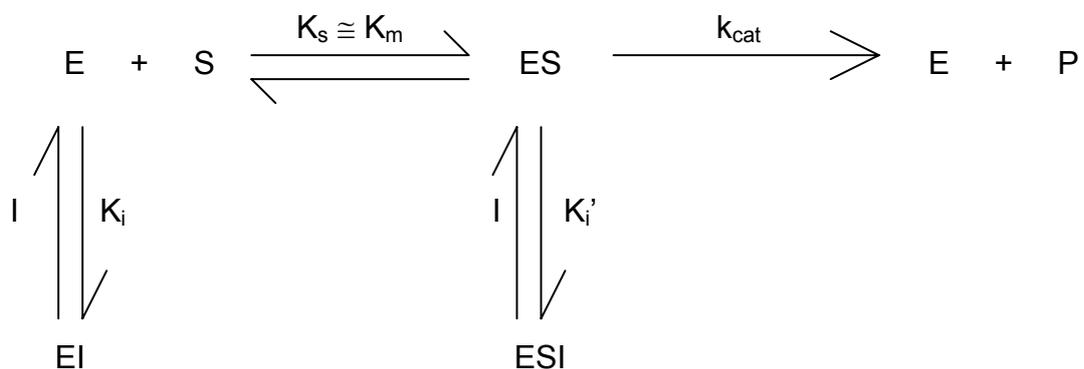
ϵM = absorvidade molar da 4-Nan ($8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (ERLANGER *et al.*, 1961).

$[\beta\text{-TR}]$ = concentração real, em centro ativo, da $\beta\text{-TRB}$ no ensaio

Para cada concentração do substrato eram realizadas incubações na ausência da 4-Nan e na presença de concentrações crescentes da 4-NAn.

3.5.2 Tratamento dos dados cinéticos

Os dados cinéticos para a inibição da $\beta\text{-TRB}$ pela 4-NAN podem ser descritos pelo seguinte esquema:



De acordo com Cornish-Bowden (1981) é o mais simples mecanismo formal para inibição mista, onde o inibidor liga-se à enzima livre E para formar o complexo enzima-

inibidor EI, com uma constante de inibição K_i e ao complexo enzima-substrato ES para formar o complexo enzima-substrato-inibidor ESI, com a constante de inibição K_i' .

A velocidade inicial (v), corrigida pela concentração da enzima, é dada pela seguinte equação:

$$\frac{v_i}{[E_0]} = v = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_m \cdot (1 + [I]/K_i) + [S] \cdot (1 + [I]/K_i')} \quad \text{Eq. 1}$$

Segundo Cornish–Bowden (1981), quando a inibição mista linear ocorre, ambos k_{cat}^{ap} e k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} variam com a concentração do inibidor de acordo com as seguintes equações:

$$k_{cat}^{ap} = \frac{k_{cat}}{1 + [I]/K_i'} \quad \text{Eq. 2}$$

que pode ser rearranjada para:

$$1/k_{cat}^{ap} = 1/k_{cat} + (1/k_{cat} \cdot K_i') \cdot [I] \quad \text{Eq. 3}$$

$$K_m^{ap} = \frac{K_m (1 + [I]/K_i)}{1 + [I]/K_i'} \quad \text{Eq. 4}$$

e

$$k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} = \frac{k_{cat}/K_m}{1 + [I]/K_i} \quad \text{Eq. 5}$$

que pode ser rearranjada para:

$$K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} = K_m/k_{cat} + [K_m/(k_{cat} \cdot K_i)] \cdot [I] \quad \text{Eq. 6}$$

Os dados experimentais foram tratados desenhando-se, preliminarmente, os gráficos de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf, utilizando-se o programa de computador Sigma Plot 8.0.

Os valores dos parâmetros cinéticos V_{max} , K_m e k_{cat} foram calculados e os gráficos de K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} e $1/k_{cat}^{ap}$, em função da concentração da 4-Nan, foram desenhados utilizando-se o mesmo programa.

Da inclinação da curva do gráfico de K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} em função da [4-NAn] foi calculado o valor do K_i e da inclinação da curva do gráfico de $1/k_{cat}^{ap}$ em função da [NAn] foi calculado o K_i' .

O gráfico de Lineweaver-Burk é a linearização da equação de Michaelis-Menten e o gráfico de Hanes-Woolf é um rearranjo da equação de Lineweaver-Burk.

3.5.3 Análise estatística dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} , K_m^{ap} e k_{cat}^{ap} para as hidrólises do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisadas pela β -TRB, na ausência e na presença da 4-NAn foram calculados por regressão não linear, sem peso estatístico, ajustando-se os dados à equação de Michaelis-Menten, utilizando-se o programa de computador Sigma Plot 8.0.

Os valores de K_i e K_i' para a inibição do tipo mista da β -TRB pela 4-NAn foram calculados a partir dos gráficos de K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} vs [I] e de $1/k_{cat}^{ap}$ vs [I], respectivamente.

3.5.4 Estudo da estabilidade da solução estoque da β -tripsina bovina

A solução estoque da β -TRB (67,8 μ M) foi distribuída em alíquotas de 100 μ L e estas alíquotas foram armazenadas a -20°C . Uma alíquota era retirada do freezer, mensalmente, descongelada no banho de gelo e sua atividade amidásica era determinada, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, durante um período de seis meses, conforme item 3.5.1.2.

4 RESULTADOS

4.1 Inibições da atividade amidásica da β -Tripsina bovina (β -TRB) pela 4-nitroanilina (4-NAn) com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan

A hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela de β -TRB, seguiu a cinética de Michaelis-Menten na faixa de concentrações do substrato ensaiada (80 a 640 μ M). A Figura 4 ilustra o Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan (80 a 640 μ M), catalisada pela β -TRB, na ausência e na presença de diferentes concentrações de 4-Nan (0,068 a 0,307 mM). Cada ponto deste gráfico e dos demais apresentados neste trabalho representa a média das determinações em quadruplicatas.

Neste gráfico é possível observar a diminuição das velocidades de hidrólise do substrato, catalisadas pela β -TRB, na presença de 4-NAn, em relação às velocidades de hidrólise do substrato na ausência da 4-NAn, indicando inibição da enzima.

A Figura 5 ilustra o gráfico de Lineweaver-Burk para os dados apresentados na figura anterior. Observa-se que as quatro linhas retas inferiores (\bullet , \circ , Δ e Δ) correspondentes à ausência de inibidor e às três concentrações mais baixas do inibidor cruzam-se aproximadamente no mesmo ponto, no segundo quadrante, sugerindo inibição mista. Porém, as retas correspondentes às concentrações maiores do inibidor (\square , \square , \diamond e \blacklozenge) cruzam-se com as primeiras em pontos completamente diferentes, indicando uma inibição mais complexa da enzima.

A Figura 6 ilustra o gráfico de Hanes-Woolf. Observa-se que as linhas retas correspondentes à experiência na ausência do inibidor e na presença das sete concentrações do inibidor, utilizadas no ensaio, convergem-se para um mesmo ponto no segundo quadrante, indicando, também, uma inibição mista.

Na Tabela 4, estão apresentados os valores dos parâmetros cinéticos k_{cat}^{ap} , K_m^{ap} , k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} , $1/k_{cat}^{ap}$ e K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} para as hidrólises do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisadas pela β -TRB, na ausência e na presença da 4-NAn.

Tabela 4 - Valores dos parâmetros cinéticos para a reação de hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan catalisada pela β -TRB na ausência e na presença da 4-NAn

4-NAn (mM)	k_{cat}^{ap} (min^{-1})	K_m^{ap} (μM)	k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)	$1/k_{cat}^{ap} \times 10^{-4}$ (min)	K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$)
0	3366 ± 38	$168,3 \pm 6,3$	20,0	2,97	0,050
0,068	3227 ± 59	$169,2 \pm 8,4$	19,1	3,09	0,052
0,136	3043 ± 100	$173,0 \pm 15,7$	17,6	3,29	0,057
0,170	2819 ± 150	$183,3 \pm 25,8$	15,3	3,55	0,065
0,205	2274 ± 172	$159,3 \pm 33,6$	14,3	4,40	0,070
0,239	1699 ± 120	$137,2 \pm 28,9$	12,4	5,89	0,081
0,273	1253 ± 100	$152,9 \pm 34,8$	8,2	7,98	0,122
0,307	977 ± 100	$159,4 \pm 45,3$	6,1	10,24	0,163

Pode-se observar, na Tabela, 4 os efeitos da 4-NAn sobre os parâmetros cinéticos k_{cat}^{ap} , K_m^{ap} e sobre as relações dos parâmetros cinéticos k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} , $1/k_{cat}^{ap}$ e K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} da β -TRB. Os valores de k_{cat}^{ap} , k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} , $1/k_{cat}^{ap}$ e K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} foram modificados na presença do inibidor, enquanto os valores de K_m^{ap} não variaram, dentro do erro experimental, na presença das crescentes concentrações do inibidor.

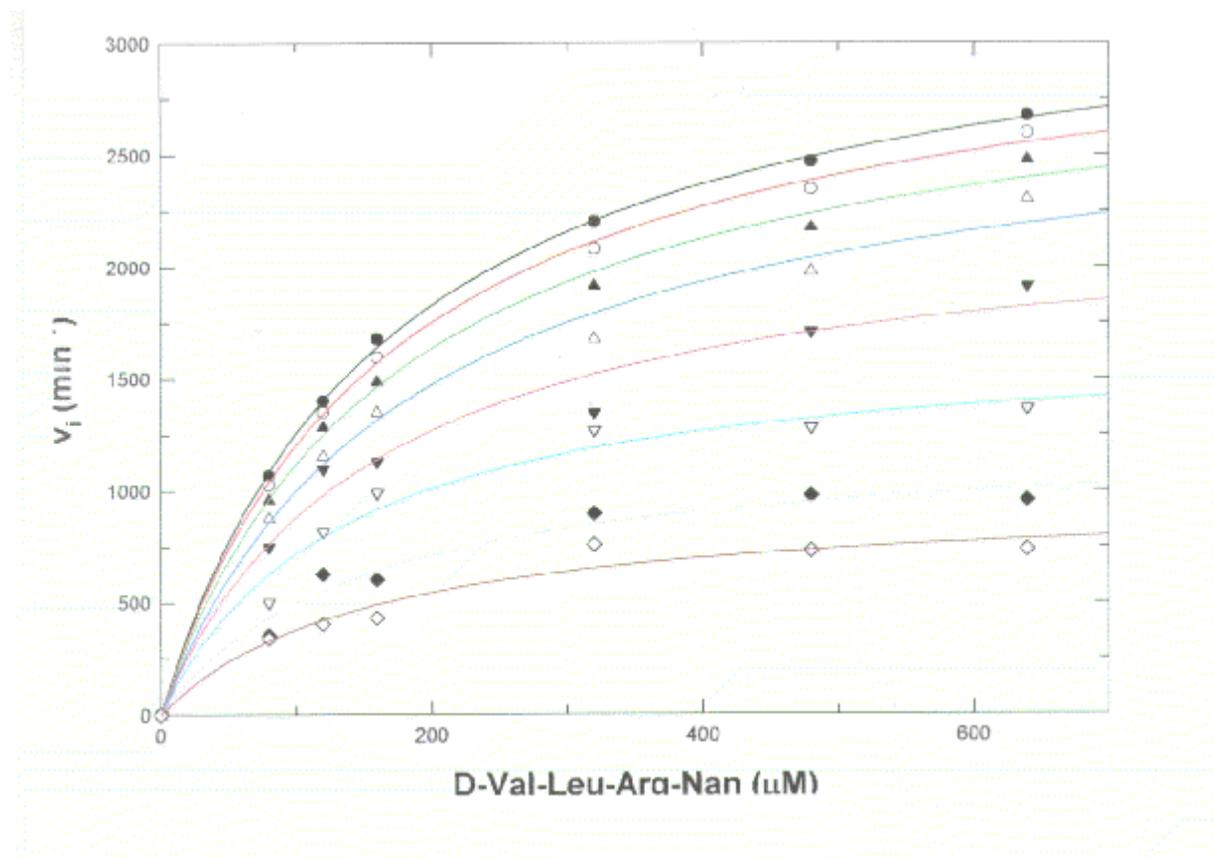
A Figura 7 ilustra os gráficos de K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} e $1/k_{cat}^{ap}$ em função da concentração da 4-NAn. Os valores calculados de K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} e $1/k_{cat}^{ap}$ na ausência e na presença da 4-NAn nas concentrações 0,068 mM e 0,136 mM, situam-se em linhas retas. Nas concentrações maiores da 4-NAn, observa-se um desvio crescente das respectivas curvas, que ajustam-se à regressões de segunda ordem, indicando a ligação de duas moléculas do inibidor à mesma molécula da enzima. Das inclinações das porções retas das linhas de K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} e $1/k_{cat}^{ap}$ em função da concentração da 4-NAn, foram calculados os valores de K_i e K_i' , que estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores das constantes de inibição, K_i e K_i' , para a inibição da β -TRB pela 4-NAn

Inibidor	K_i (mM)	K_i' (mM)
4-Nan	$1,00 \pm 11,2$	$1,28 \pm 18,1$

4.2 Estudo da estabilidade da solução estoque da β -tripsina bovina

O estudo da estabilidade da β -TRB armazenada e conservada a -20°C durante o período de 6 meses, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan na concentração de 640 μM , revelou que a enzima não perdeu a sua atividade.



Legenda

●—● 4-NAn 0,0

○—○ 4-NAn 0,068 mM

△—△ 4-NAn 0,136 mM

△—△ 4-NAn 0,170 mM

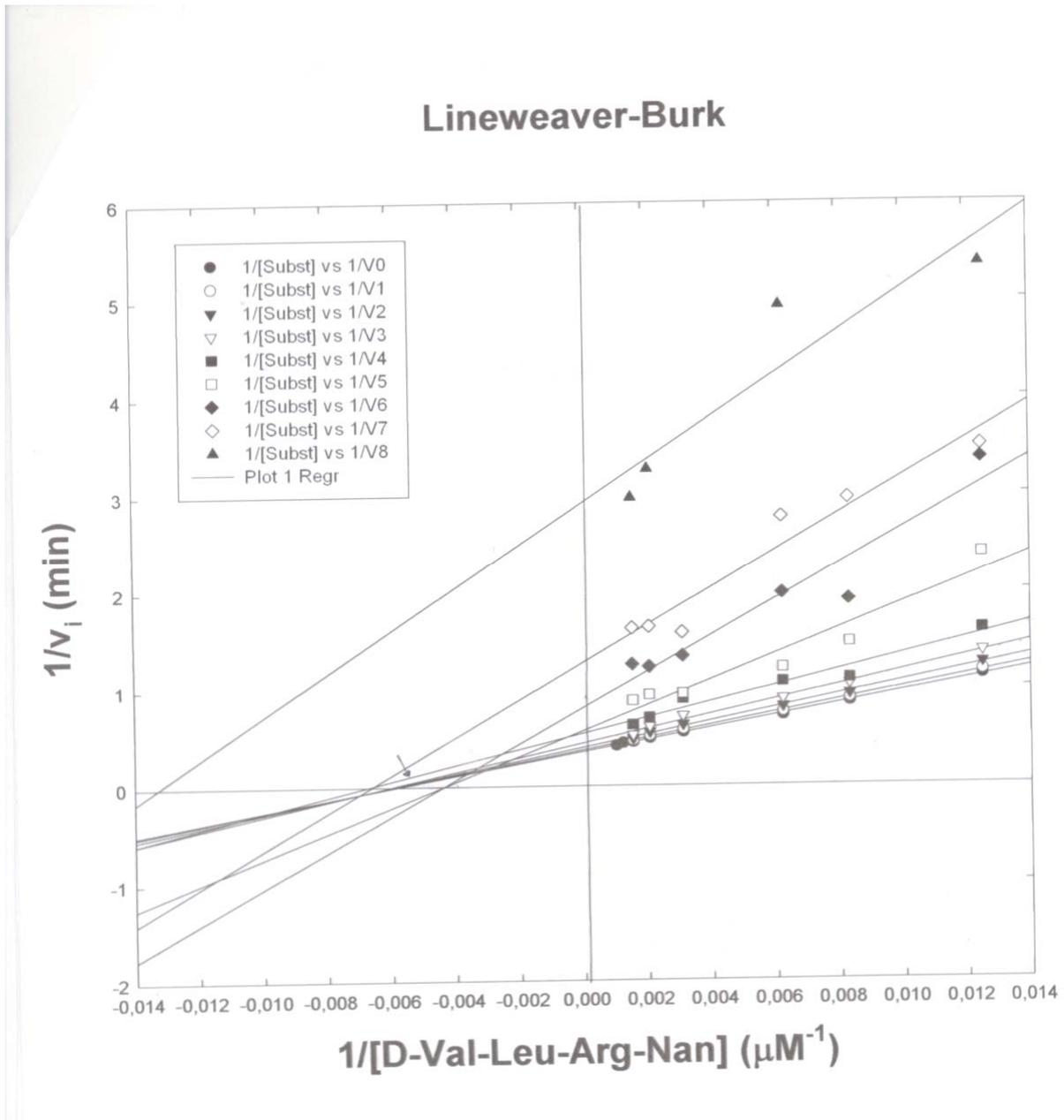
▽—▽ 4-NAn 0,205 mM

▽—▽ 4-NAn 0,239 mM

◆—◆ 4-NAn 0,273 mM

◇—◇ 4-NAn 0,307 mM

FIGURA 4 Gráfico de Michaelis-Menten para hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β -tripsina bovina, na ausência e na presença de 4-NAn.



Legenda

●—● 4-NAn 0,0

○—○ 4-NAn 0,068 mM

▽—▽ 4-NAn 0,136 mM

▽—▽ 4-NAn 0,170 mM

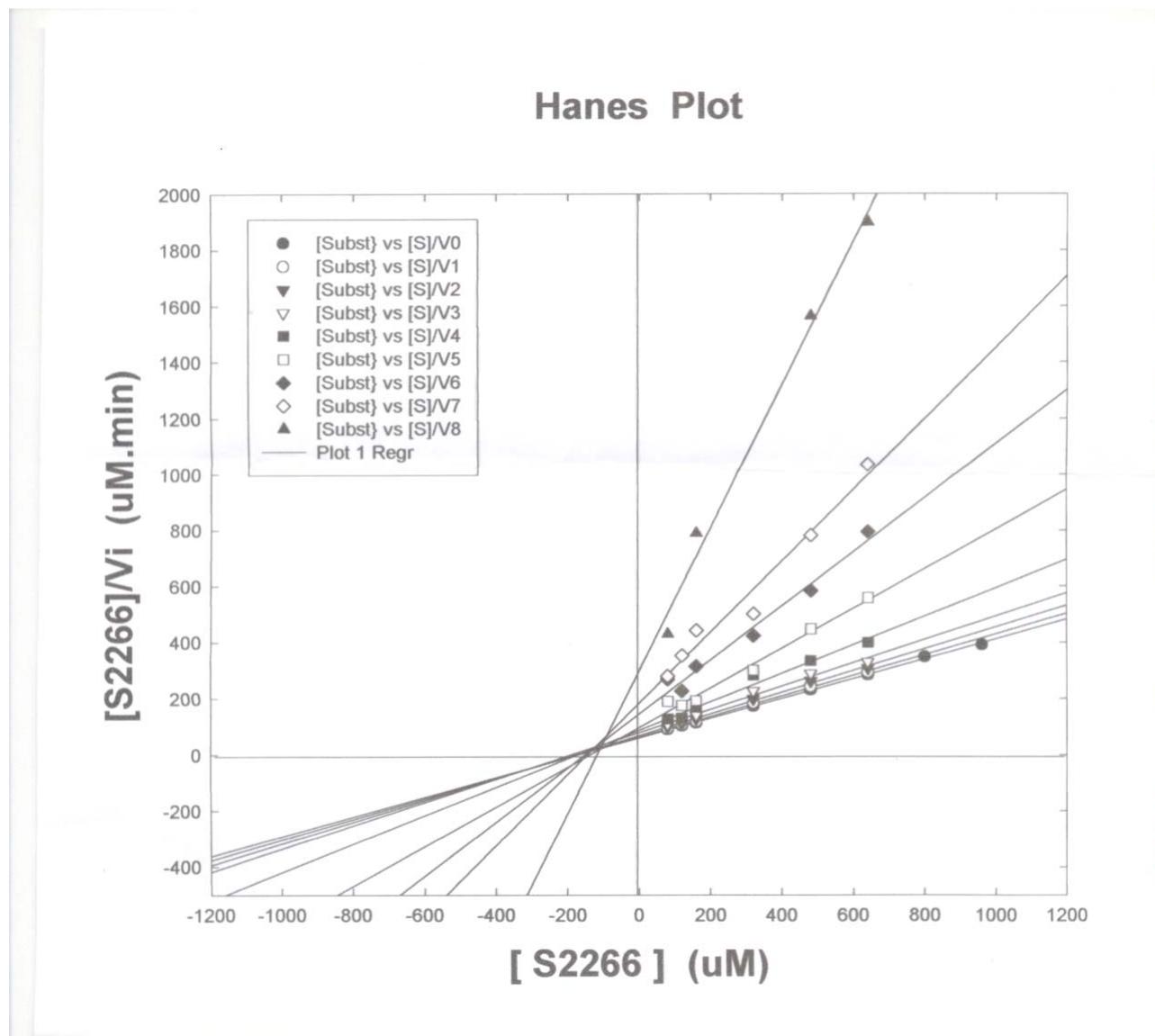
□—□ 4-NAn 0,205 mM

□—□ 4-NAn 0,239 mM

◆—◆ 4-NAn 0,273 mM

◇—◇ 4-NAn 0,307 mM

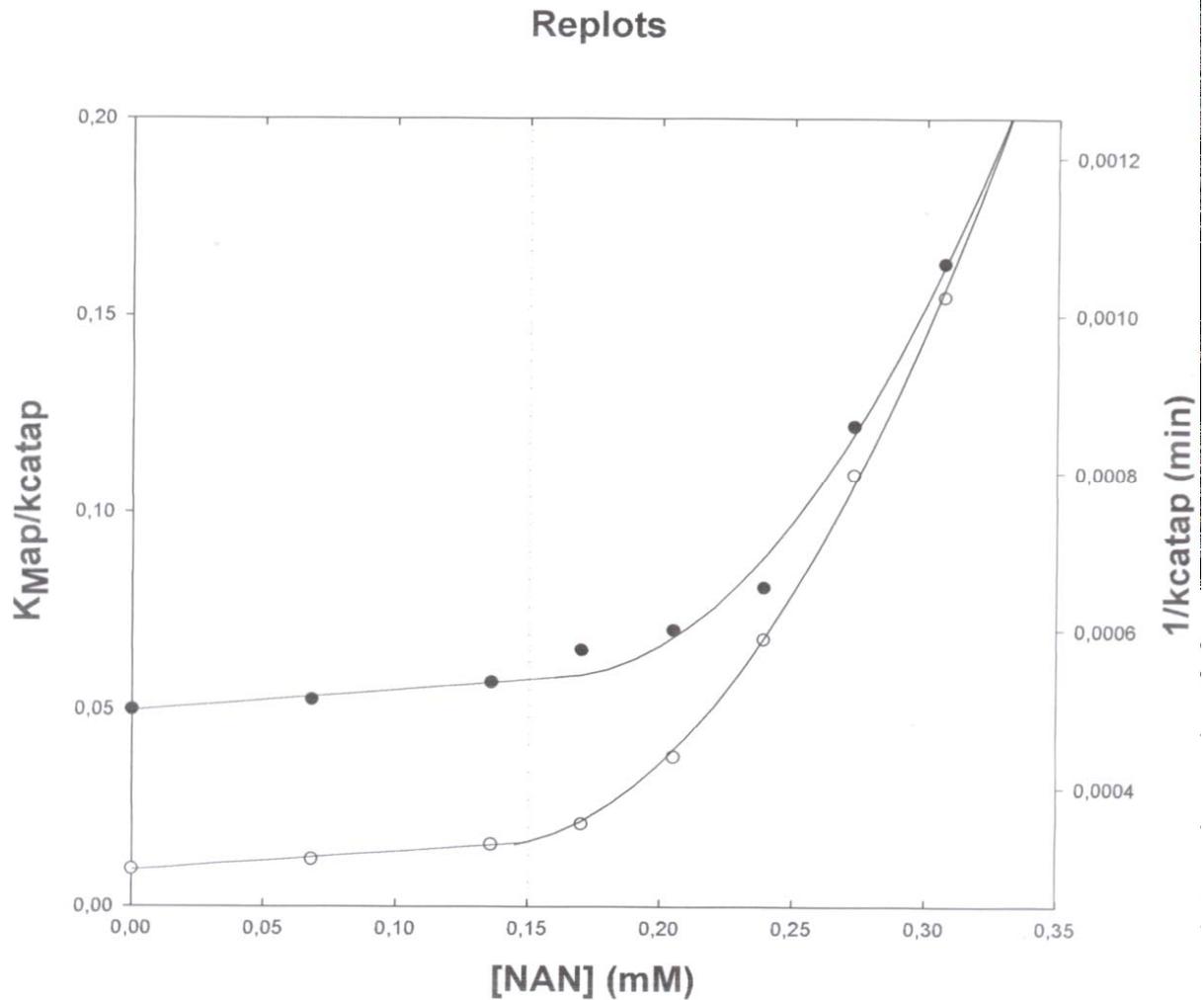
FIGURA 5 Gráfico de Lineweaver-Burk para hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β -tripsina bovina, na ausência e na presença de 4-NAn.



Legenda

- | | |
|--------------------|--------------------|
| ●—● 4-NAn 0,0 | ○—○ 4-NAn 0,068 mM |
| ▽—▽ 4-NAn 0,136 mM | ▽—▽ 4-NAn 0,170 mM |
| □—□ 4-NAn 0,205 mM | □—□ 4-NAn 0,239 mM |
| ◆—◆ 4-NAn 0,273 mM | ◇—◇ 4-NAn 0,307 mM |

FIGURA 6 Gráfico de Hanes-Woolf para hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β -tripsina bovina, na ausência e na presença de 4-NAn.



Legenda

●—● K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) vs [4-NAn] (mM)

○—○ $1/k_{cat}^{ap}$ (min) vs [4-NAn] (mM)

FIGURA 7 Gráfico dos parâmetros cinéticos K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} e $1/k_{cat}^{ap}$ da β -tripsina bovina em função da concentração da 4-NAn.

5 DISCUSSÃO

5.1 Cinética da inibição da atividade amidásica da β -tripsina bovina (β -TRB) pela 4-nitroanilina (4-NAn), com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan

O objetivo deste estudo foi aprofundar os conhecimentos sobre a cinética da inibição da atividade amidásica da β -TRB pela 4-NAn, visando identificar os mecanismos de inibição, determinar o número de sítios de ligação e as suas respectivas constantes de inibição (K_i).

A β -tripsina foi escolhida por ser um bom modelo experimental para estudos de caracterização das serino proteases, visto ser uma enzima com características cinéticas e as estruturas bem definidas. A 4-NAn foi utilizada no estudo da inibição da β -TRB por ser um dos produtos de hidrólise dos substratos, do tipo anilida, utilizados nos ensaios cinéticos. Por outro lado, a 4-NAn foi demonstrada ser um inibidor do tipo misto linear da calicreína tecidual humana (hK1), uma serino protease, em alguns aspectos, semelhante à β -tripsina (SOUSA, 2001).

O Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, catalisada pela β -TRB, na ausência e na presença da 4-NAn (FIGURA 4) evidencia a inibição da enzima por este composto.

O gráfico de Lineweaver-Burk, correspondente aos dados da Figura 4, apresentado na Figura 5, indica que a inibição é mista, pois as quatro primeiras linhas retas obtidas na ausência da 4-NAn e na presença das três menores concentrações da 4-NAn (0,068; 0,136 e 0,170 mM), mostraram-se convergentes para um único ponto no segundo quadrante, próximo ao eixo da abcissa ($1/[D\text{-Val-Leu-Arg-Nan}]$). As outras linhas retas correspondentes às concentrações mais elevadas da 4-NAn indicam a inibição mais complexa da enzima.

Para confirmar o diagnóstico do tipo de inibição, desenhou-se o gráfico de Hanes-Woolf, onde mostra que as linhas retas, correspondentes às diversas

concentrações do inibidor, cruzam com a linha reta correspondente à ausência do inibidor em pontos muito próximos, no segundo quadrante, indicando que a inibição é do tipo mista (FIGURA 6).

Há uma diferença visível entre os gráficos de Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf (FIG. 5 e 6).

Segundo Segel (1975), o gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk ($1/v$ vs $1/[S]$) é o gráfico mais usado para o diagnóstico primário da inibição enzimática. Entretanto, segundo o autor, o uso deste gráfico tem sido criticado em dois pontos: aumentos iguais da concentração do substrato que produzem pontos igualmente separados no gráfico básico de (v vs $[S]$) (Michaelis-Menten), não produzem pontos igualmente separados no gráfico de duplos recíprocos. Por exemplo, valores de $[S]$ iguais a 1, 2, 3 e assim por diante, produzirão valores recíprocos que tendem a se agrupar próximo ao eixo de $1/v$. Assim, haverá relativamente poucos pontos no lado mais alto da escala de $1/[S]$ e estes pontos são os que têm mais peso no ajuste visual subjetivo da linha. A segunda e mais importante crítica é que pequenos erros na determinação de v são amplificados quando os recíprocos são tomados. Erros na determinação de v são prováveis de ser significativos em baixas concentrações de substratos (baixos valores de v). Um ou dois pontos ruins de $1/v$ para valores mais altos de $1/[S]$ podem introduzir um notável erro na inclinação da reta.

Para desenhar o gráfico de Hanes-Woolf ($[S]/v$ vs $[S]$), a equação de Lineweaver-Burk é rearranjada multiplicando-se ambos os lados por $[S]$, como descrito a seguir:

Equação de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Multiplicando ambos os lados da equação pela [S]:

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{[S] K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V_{max}} \quad \text{ou:}$$

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{1}{V_{max}} \times [S] + \frac{K_M}{V_{max}}$$

Equação de Hanes-Woolf produzida a partir do rearranjo da equação de Lineweaver-Burk

Fonte: SEGEL, 1975, p. 210.

Tanto o gráfico de Hanes-Woolf (FIGURA 6) quanto o gráfico das relações K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} e $1/k_{cat}^{ap}$ em função da [4-NAn] (FIGURA 7) sinalizam a presença de dois comportamentos da enzima frente a 4-NAn. Os resultados indicam um comportamento até a concentração de aproximadamente 0,150 mM da 4-NAn, em que há uma inibição mista linear e um outro comportamento com as concentrações acima de 0,150 mM da 4-NAn, onde observa-se uma inibição do tipo parabólica. Para esclarecer melhor o segundo comportamento, serão necessários estudos mais aprofundados; portanto, será abordado apenas o primeiro comportamento.

Os valores dos parâmetros cinéticos K_i , e K_i' podem ser determinados a partir dos gráficos dos parâmetros K_m^{ap}/k_{cat}^{ap} e $1/k_{cat}^{ap}$ em função da [4-NAn], respectivamente. A partir das regressões lineares foram obtidos os valores das duas constantes de inibição $K_i = 1,00 \pm 11,2$ mM e $K_i' = 1,28 \pm 18,1$ mM, que são iguais, dentro do erro experimental (TABELA 5).

Os dados cinéticos obtidos para a 4-NAn foram tratados segundo CORNISH-BOWDEN (1981), para a avaliação dos efeitos do inibidor sobre os parâmetros cinéticos K_m^{ap} e k_{cat}^{ap} . Os parâmetros k_{cat}^{ap} e k_{cat}^{ap}/K_m^{ap} , como podem ser observados na Tabela 4, decresceram com o aumento da concentração do inibidor e os valores de K_m^{ap} mantiveram-se constantes, dentro do erro experimental. Estes dados cinéticos são consistentes com a inibição não competitiva pura, que segundo o autor, é um caso especial de inibição mista linear, na qual os valores de K_i e K_i' são iguais.

Os resultados indicam a presença de um segundo sítio de ligação para a 4-NAn, na β -TRB.

O valor de K_m para a β -TRB ($168,3 \pm 6,3 \mu\text{M}$) com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan estimado, neste trabalho, é semelhante aos valores publicados por OLIVEIRA (1993) ($180 \mu\text{M}$) e por SOUSA (2001) ($191,7 \mu\text{M}$).

O valor de K_m para β -TRB ($168,3 \pm 6,3 \mu\text{M}$), estimado neste trabalho, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan é cerca de quatorze vezes maior do que o valor de K_m para a hK1 ($12,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$), com o mesmo substrato (SOUSA,2001), indicando que a hK1 possui maior afinidade por este substrato. Porém, quando compara-se os valores de k_{cat} das duas enzimas, observa-se que o da β -TRB ($3366 \pm 38 \text{ min}^{-1}$) é aproximadamente setenta vezes maior do que o da hK1 ($48,4 \pm 1,0 \text{ min}^{-1}$), indicando maior eficiência catalítica da β -TRB.

A comparação entre o valor de k_{cat} , encontrado neste trabalho, para a β -TRB com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan ($3366 \pm 38 \text{ min}^{-1}$) e o valor de k_{cat} encontrado por SOUSA *et al.* (2001) ($1604 \pm 107 \text{ min}^{-1}$) mostra que a primeira é cerca de duas vezes mais eficiente e, quando comparado com o valor encontrado por JUNQUEIRA, SILVA e MARES-GUIA (1992) (2058 min^{-1}) e por OLIVEIRA *et al.* (1993) (2058 min^{-1}) mostra

que a β -TRB, utilizada neste trabalho, é cerca de 1,6 vezes mais eficiente do que a utilizada por esses autores.

As diferenças encontradas entre os valores de k_{cat} da β -TRB, com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, deste estudo e dos três autores citados, podem ser explicadas em função das metodologias de purificação da β -TRB utilizadas. Nos trabalhos de JUNQUEIRA, SILVA E MARES-GUIA (1992), OLIVEIRA *et al.* (1993) e de SOUSA *et al.* (2001), a β -TRB foi purificada pelo método de SCHROEDER e SHAW (1968), modificada por DIAS e ROGANA (1986). No presente trabalho foi utilizada uma β -TRB purificada por um método otimizado de purificação, descrito por SANTOS *et al.* (2007).

A comparação entre os valores de K_i para as inibições, pela 4-NAn, da hK1 ($36,8 \pm 5,2 \mu\text{M}$) e da β -TRB ($1000 \pm 11200 \mu\text{M}$), revela que o inibidor interage cerca de vinte e sete vezes melhor com o subsítio S_1 do centro ativo da hK1 do que com o subsítio S_1 do centro ativo da β -TRB. Além disso, a comparação dos valores de K_i' para as inibições, pela 4-NAn, da hK1 ($289 \pm 93 \mu\text{M}$) e da β -TRB ($1280 \pm 18100 \mu\text{M}$), mostra que o inibidor também interage melhor com o segundo sítio de ligação da hK1 do que com o segundo sítio de ligação da β -TRB. Na inibição da hK1 pela 4-NAn pode ser observada, através dos valores de K_i e K_i' , uma interação mais forte do inibidor com o subsítio S_1 do centro ativo da enzima do que com o segundo sítio de ligação. Entretanto, na inibição da β -TRB, pela 4-NAn, não é observada essa diferença nas forças de ligação com os dois sítios citados, visto que, os valores das constantes de inibição são iguais, dentro do erro experimental.

A inibição da 4-NAn foi comparada, também, com dados da literatura de outros inibidores, como a benzamidina (BzA), a p-aminobenzamidina (p-ABzA) e a anilina (An).

Comparando-se os valores de K_i para a inibição da β -TRB, pela 4-NAn ($pK_a = 1,00$) ($1000 \pm 11200 \mu\text{M}$), pela BzA ($pK_a = 11,41$) ($18,4 \mu\text{M}$) e pela p-ABzA ($pK_a =$

12,39) (8,25 μM) (MARES-GUIA e SHAW, 1964), e pela An ($\text{pK}_a = 4,60$) ($10800 \pm 1000 \mu\text{M}$) (SOUSA *et al.*, 2001), observa-se que a ligação da An ao centro ativo da β -TRB é a que possui menor afinidade, seguida da 4-NAn e da BzA, respectivamente, e a p-ABzA é a que apresenta a maior afinidade, sendo a 4-NAn, portanto, um inibidor melhor do que a An, mas menos eficiente do que a p-ABzA e a BzA.

Considerando-se que em pH 8,1 os grupos amidínicos da p-ABzA e da BzA apresentam uma carga positiva real, é razoável esperar que esses compostos interajam melhor com o subsítio S_1 do centro ativo da β -TRB. A interação maior com a p-ABzA em relação à BzA poderia ser explicada, como foi sugerida por MARES-GUIA *et al.* (1977), em termos de uma interação do tipo dipolo-dipolo nas benzamidas *para*-substituídas. Um dipolo aparecerá no inibidor como consequência de uma transferência intramolecular de carga do substituinte para o anel e vice-versa, que será capaz de interagir com um sítio na enzima. Segundo os autores, o grupo hidroxila da Ser¹⁸³ reativa é o mais provável candidato para o dipolo da enzima, que interage com o dipolo na posição *para*, nas benzamidas substituídas.

A 4-NAn é um composto que em pH 8,1 não mostra uma carga positiva nítida, mas uma carga positiva induzida por transferência intramolecular de elétrons do grupo amino para o grupo nitro, por ressonância isovalente, tornando o grupamento nitro com um σ^- e o grupamento amino com σ^+ (CRAM e HAMMOND, 1964), o que explicaria sua ligação no centro ativo da enzima. Por outro lado, a 4-NAn após ligar-se ao subsítio S_1 do centro ativo da β -TRB, possivelmente, apresenta uma repulsão enzima-inibidor do tipo dipolo-dipolo, envolvendo as cargas negativas do átomo de oxigênio do grupo nitro na posição C4 do anel aromático, induzida por ressonância, e o grupo hidroxila da Ser¹⁸³, o que poderia explicar a menor afinidade da β -TRB pela 4-NAn em relação às benzamidas. Já a anilina é um pior inibidor do que a 4-NAn, provavelmente, porque apresenta um σ^+ mais fraco no grupamento amino, devido à ausência de um grupo

retirador de elétrons na posição C4 do anel aromático e, assim, a sua interação com o sítio aniônico da enzima é mais fraca.

Interação semelhante foi sugerida por SOUSA *et al.* (2001), para explicar seus resultados sobre o efeito inibidor da hK1 pela 4-NAn. Porém, a interação da hK1 com a 4-NAn apresentou-se mais forte ($K_i = 36,8 \mu\text{M}$), quando comparada com a interação da β -TRB com a 4-Nan ($K_i = 1000 \mu\text{M}$), o que poderia ser explicado devido a uma interação vinte e sete vezes menos intensa com esta enzima.

Finalmente, o fato da 4-NAn não ser o inibidor com maior eficiência não diminui a sua importância, já que este composto é um dos produtos da hidrólise dos substratos do tipo anilida, pelas serino proteases, semelhantes à tripsina.

5.2 Perspectivas

A β -tripsina é uma serino protease modelo e além disso, está envolvida em doenças de alta gravidade como pancreatite e cancer, principalmente, o cancer colorretal. O estudo de inibidores de serino proteases e no caso específico da β -tripsina é de fundamental importância no desenvolvimento de pesquisas farmacêuticas de inibidores/fármacos, que poderão futuramente serem utilizados no tratamento de várias doenças; bem como, no estudo mais aprofundado dos mecanismos fisiológicas desta enzima.

Tendo-se em vista a necessidade do conhecimento mais aprofundado desta enzima, baseado nos fatos citados acima e os resultados obtidos neste trabalho, será necessário mais estudos com outras metodologias, como por exemplo, a microcalorimetria. Estes estudos poderão esclarecer melhor a inibição da β -tripsina

bovina pela 4-nitroanilina em concentrações mais altas, em que foi detectado um aumento maior na inibição, como pode ser visto através dos gráficos apresentados no trabalho.

6 CONCLUSÕES

Analisando-se os resultados do atual estudo pode-se concluir que:

- As hidrólises, catalisadas pela β -tripsina bovina, do substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, revelam que a enzima segue a cinética de Michaelis-Menten, em toda a faixa de concentrações utilizada do substrato.
- A 4-nitroanilina é um inibidor misto da β -tripsina bovina. Assim, este composto é capaz de se ligar tanto à enzima livre, formando o complexo binário [EI], quanto ao complexo enzima-substrato [ES], formando o complexo ternário enzima-substrato-inibidor [ESI] inativo. Este tipo de inibição indica a existência de um segundo sítio, diferente do centro ativo, ao qual se liga a molécula do inibidor.
- A p-aminobenzamidina e a benzamidina são inibidores competitivos da tripsina (MARES-GUIA e SHAW, 1965), implicando assim, na combinação destas amidinas apenas no sítio aniônico da enzima, formando o complexo binário [EI]. Portanto, o comportamento cinético da tripsina com estes dois inibidores é diferente do comportamento cinético desta enzima com a 4-nitroanilina.
- A inibição da β -tripsina bovina (β -TRB) pela 4-nitroanilina apresenta dois comportamentos, uma inibição mista linear, na presença de concentrações mais baixas do inibidor e uma inibição do tipo parabólica, na presença de concentrações mais altas do inibidor, a qual é objeto de mais estudos. Já a inibição da calicreína tecidual humana (hK1) pela 4-NAn é do tipo mista linear. O estudo revelou a presença de dois sítios de ligação, assim, como ocorre na hK1, o centro ativo propriamente dito e um segundo sítio, com afinidades iguais para a β -TRB e afinidades diferentes para a hK1. Portanto, com este inibidor, o comportamento

cinético da β -tripsina apresenta-se de forma diferente ao da hK1, bem como, as suas afinidades pelo inibidor e a eficiência catalítica.

- A inibição da β -tripsina bovina, uma serino protease modelo, pela 4-nitroanilina é extremamente importante, visto que, este composto é um dos produtos da hidrólise de substratos, do tipo anilida, pela enzima. O efeito inibidor pode introduzir erros em experimentos de determinações da atividade amidásica da enzima, realizados com incubações em tempo fixo, principalmente, se o tempo de incubação for longo.
- A verificação da estabilidade, durante o período de 6 meses, da β -tripsina bovina, em solução de HCl 10^{-3} M, armazenada em alíquotas conservadas a -20°C é um dado importante nas pesquisas que envolvem esta enzima, uma vez que não há informações na literatura sobre esta estabilidade. A boa estabilidade da β -TRB, nas condições mencionadas acima, é de grande valor, pois assim, pode-se partir de uma mesma solução estoque da enzima durante todo o ensaio, possibilitando a padronização do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M.H.G.; SILVE, E.; MARES-GUIA.M. A plausible identification of the secondary binding site in trypsin and trypsinogen. *Brazilian Journal Med. Biol. Res.* V.23, p.1223-1231, 1990.

ASHLEY, P.L.; MAC DONALD, R.J. Tissue-specific expression of kallikrein related genes in the rat. *Biochemistry*, v. 22, p. 4520-4527, 1985.

BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins, kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacological Reviews*, v.44, p.1-80, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 238-245, 1976.

CORNISH-BOWDEN, A. Inhibitors and activators. In: CORNISH-BOWDEN, A. (Ed). *Fundamentals of enzyme kinetics*. 2^a th. London: Butterworths, 1981. P.73-98.

CRAIK, C.S.; LARGMAN,C.; FLETCHER, T.; ROCZNAIDK, S.; BARR, P.J.;FLETTERICK, R.; RUTTER, W.J. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity., *Science* v.228, p.291-297, 1985.

CHRISTOVA, E.; PETKOV, D.D.; STOINEVA, I. S'2-P'2 interaction and the trypsin anilide hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.218(2), p.629-639, 1982.

CZAPINSKA, H.; OTLEWSKII, J. Structural and energetic determinants of S₁-site specificity in serine proteases. *Eur. J. Biochem.*, v 260,p. 571-595, 1999.

DIAMANDIS, E.P.; YOUSEF, G.M. Human tissue kallikrein: a family of new cancer biomarkers. *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 8, p. 1198-1205, 2002.

DIAS, C.L.F.; ROGANA, E. Autolysis of β -trypsin at pH 3,0. *Brazilian J. Med. Biol.* V.19, p.11-18, 1986.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, v.95, p.271-278, 1961.

GONTIJO, D.T.A. Caracterização cinética da calicreína tecidual do rato (rK1) com os inibidores da tripsina: benzamidina, 4-animobenzamidina e 4-nitrobenzamidina. Dissertação de mestrado. PPGCF, 2005.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. *Braz. J. Med. Biol. Res. Ribeirão Preto*, v.25, p.873-887, 1992.

GÜNTHER, A.R.; SANTORO,M.M.; ROGANA,E. pH titration of native and unfolded β -trypsin: evaluation of the $\Delta\Delta G^\circ$ titration and the carboxyl pK values. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v.30, p.1281-1286, 1997.

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

LA BOMBARDI, V.J.; SHAW, E.; DISTEFANO, J.E.; BECK, G.; BROWN, F.; ZUCKER, S. Isolation and characterization of a trypsin-like serine protease from the membranes of Walker 256 carcinoma-sarcoma cells. *Biochem. J.*, v.211, p.695-700, 1983.

LU, D.; FUTTERER, K.; KOROLEV, S.; ZHENG, X.; WAKSMAN, G.; SADLER, J.E. Crystal structure of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide. *J. Mol. Biol.*, v.292, p.361-373, 1999.

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. *The Journal of Biological Chemistry*. v.240, p.1579-1585, 1965.

MAEDA, K.; HIROTA, M.; KIMURA, Y.; ICHIHARA, A.; OHMURAYA, M.; SUGITA, H.; OGAWA, M. Proinflammatory role of trypsin and protease-activated receptor-2 in a rat model of acute pancreatitis. *Pancreas*. v.31(1), p.54-62, 2005.

MARES-GUIA, M.; NELSON, D.L.; ROGANA, E. Electronic effects in the interaction of para-substituted benzamidines with trypsin: the involvement of the π -electronic density at the central atom of the substituent in binding. *J. Amer. Chem. Soc.*, Easton, v.99, p.2331-2336, 1977.

MASON, A.J.; EVANS, B.A.; COX, D.R.; SHINE, J.; RICHARDS, R.J. Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides. *Nature*, v.303, p. 300-307, 1983.

MIRANDA, T.L.S.; RAMOS, C.H.I.; FREIRE, R.T.S.; SOUZA, E.P.; ROGANA, E.; SANTORO, M.M.; FIGUEIREDO, A.F.S. Kinetic mechanism of the inhibition of human urinary kallikrein by basic pancreatic trypsin inhibitor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.28, p.505-512, 1995.

MULLER-ESTERL, W.; IWANAGA, S.; NAKANISHI, S. Kininogens revisited. *Trends in Biochemical Sciences*, Amsterdam, v. 11, p. 336-339, 1986.

NEEDLEMAN, P.; KEY, S.L.; DENNY, S.E.; ISAKSON, P.C.; MARSHALL, G.R. The mechanism and modification of bradykinin-induced coronary vasodilation. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, v.72, p.2060-2063, 1975.

NISHIMURA, K.; SHIMIZU, H.; KOKUBU, T. Existence of prokallikrein in the kidney. Its biochemical properties compared to three active glandular kallikreins from the kidney, serum, and urine of the rat. *Hypertension*, v.5, p.205-210, 1983.

NOLLY, H.; DE VITO, E.; CABRERA, R.; KONINCKX, A. Kinin-releasing enzyme in cardiac tissue. In *Hypertension*, New York, 1981.

NYBERG, P.; YLIPALOSAARI, M.; SORSA, T.; SALO, T. Trypsins and their role in carcinoma growth. *Experimental Cell. Research*, Finland, v.312(8), p.1219-1228, 2006.

OLIVEIRA, M.G.A.; ROGANA, E.; ROSA, J.C.; REINHOLD, B.B.; ANDRADE, M.H.; GREENE, L.J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 Is part of the substrate activation

binding site of bovine trypsin. *The Journal of Biological Chemistry*. v.268, p.26893-26903, 1993.

PETERSON, G.L. Determination of total protein. *Methods in Enzimology*, v. 91, p. 95-119, 1983.

PLOWMAN, K.M. Inhibitor studies. In:HUME, D.N.;STORK, G.; KING, E.L.; HERSCHBAECH, D.R.; POPLE, J.A. (Editors). *Enzyme kinetics*. Mc Graw-Hill Book company, New York, p.56-75, 1972.

REGOLI, D.; RHALES, N.E.; DRAPEAU, G.; DION, S. Kinin receptor subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* ,v.15, p.30-38, 1990.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin hipotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology*, v. 156, p. 261-273, 1949.

RÜHLMANN, A.; KUKLA, D.; SCHWAGER, P.; BARTELS, K.; HUBER, R. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *J. Mol. Biol.* V.7(3), p.417-436, 1973.

SANTOS, A.M.C.; OLIVEIRA, J.S.; BITTAR, E.R.; SILVA, A.L.; MARES-GUIA, M.L.; SANTORO, M.M. Improved purification process of β - and α -trypsin isoforms by ion-exchange chromatography. *Brazilian Arch.Biol. Tecnology* (prelo).

SCHACHTER, M. Kallikrein (kininogenases) – A group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological Reviews*, Baltimore, v. 31. n.1, p. 1-17, 1980.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 27, n. 2, p.157-162, 1967.

SCHECHTER, I. Mapping of the active site of proteases en the 1960s and rational design of inhibitors/drugs en the 1990s. *Curr. Protein Pept. Sci, Israel*, v.6(6), p. 501-512, 2005.

SEGEL, I.H. Enzyme kinetics –behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wiley, 1975. P.100-160; 161-226.

SOREIDE, K.; JANSSEN, E.A.; KÖRNER, H.; BAAK, J.P. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J. Pathol.* v.209(2), p.147-156, 2006.

SOUZA, M.O. Caracterização cinética da calicreína de glândulas submandibulares de rato com substratos $N\alpha$ -derivados da arginina e inibidores naturais e sintéticos. 1993. 166 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, M. O; RODRIGUES, C. V; PENA, H. B; ALVARENGA, M. G; MACHADO-COELHO, G. L. L; SANTORO, M. M; JULIANO, M. A; JULIANO, L; FIGUEIREDO, A. F. S. Kinetic characterization of rat tissue kallikrein using $N\alpha$ -substituted arginine 4-

nitroanilides and N^o-benzoyl-L-arginine ethyl ester as substrates. Brazilian Journal Biological Research, v.29(3):327-34, Mar. 1996.

SOUSA, M.O.; MIRANDA, T.L.S.; COSTA, E.B.; BITTAR, E.R.; SANTORO, M.M.; FIGUEIREDO, A.F.S. Linear competitive inhibition of human tissue kallikrein by 4-aminobenzamidine and benzamidine and linear mixed inhibition by 4-nitroaniline and aniline. Brazilian J. Med. Biol.Res., v.34, p.35-44, 2001.

STRYER, L. Bioquímica. 3^a ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, cap. 8, p.145, 1992.

TALHOUT,R.; ENGBERTS, J.B.F.N. Thermodynamic analysis of binding of p-substitued benzamidine to trypsin. Eur. J. Biochem., Netherlands, v.268, p. 1554-1560, 2001.

TRENHOLM, H.L.; SPOMER, W.E.; WOOTON, J.F. The effects of acetylation upon the activity of trypsin toward ester and amide substrates. Biochemistry, v.8(4), p.1741-1747, 1969.

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

TSUNEMATSU, H.; IMAMURA, T.; MAKISUMI, S. Kinetics of hydrolysis of N α -benzoyl-p-guanidino-L-phenylalanine p-nitroanilide by trypsin. J. Biochem., Tokyo, v.94 (1), p.123-128, 1983.

VOGEL, R.; WERLE, E. (Kallikrein Inhibitors). In: ERDÖS, E.G.;WILDE, A. Handbook of Experimental Pharmacology. Ed. Spring-Verlag, New York, v.25, p.213-249, 1970.

YAMADA, k.; ERDÖS, E.G. Kallikrein and prekallikrein of the isolation basolateral membrane of rat kidney. *Kidney International.*, v.22, p.331-337, 1982.

WEBSTER, M.E. Kallikrein in glandular tissue. In: ERDOS, E.G. (ED). *Bradykinin, kalidin and kallikrein*: Berlin: Spring-Verlag, 1970. P. 324-350. (Handbook of Experimental Pharmacology, 25).

WU,Q.; KUO, H.; DENG, G.G. Serine proteases and cardiac function. *Biochimica et Biophysica Acta, USA*, v.1751, p. 82-94, 2005.

YOUSEF, G.M.; DIAMANDIS, E. P. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biological Chemistry*, v. 383, n. 7-8, p. 1045-1057, 2002.

YOUSEF, G.M.; DIAMANDIS, E. P. The new human tissue kallikrein gene family: struture, function, and association to disease. *Endocrine Reviews*, v. 22, n. 2, p. 184-204, 2001.

YOUSEF, G.M.; CHANG, A.; SCORILAS, A.; DIAMANDIS, E. P. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromossome 19q13.3 – q13.4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 276, p. 125-133, 2000.

YOUSEF, G.M.; DIAMANDIS, E. P. An overview of the kallicrein gene families en humans and other species: Emerging candidate tumor markers. *Clinical Biochesmitry* v. 36 p. 443-452, 2003.

YOUSEF, G.M.; KOPOLOVIC, A.D.; ELLIOT,M.B.; DIAMANDIS, E. P. Genomic overview of serine proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*

v. 305, p. 28-36, 2003.