

DANIEL TÚLIO GONTIJO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA CALICREÍNA
TECIDUAL DO RATO (rK1) COM OS
INIBIDORES DA TRIPSINA: BENZAMIDINA,
4-AMINOENZAMIDINA E 4-NITROENZAMIDINA.
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA 4-NITROENZAMIDINA.**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte

2005

DANIEL TÚLIO GONTIJO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA CALICREÍNA
TECIDUAL DO RATO (rK1) COM OS
INIBIDORES DA TRIPSINA: BENZAMIDINA,
4-AMINOENZAMIDINA E 4-NITROENZAMIDINA.
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA 4-NITROENZAMIDINA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo José Alves.

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte

2005

Departamentos participantes:

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

“Não podemos pesar nosso irmão na mesma balança que nós mesmos; os poderosos podem zombar dos santos, o que não passa de gracejo; mas nos inferiores, seria odiosa profanação”.

Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me fortalecer nas angústias, por me enriquecer nos momentos de exaustão, por me ajudar a vencer todas as dificuldades encontradas na trajetória e principalmente por me iluminar com sua sabedoria o verdadeiro valor das minhas aspirações.

Para realização deste trabalho tive a colaboração de dois professores aos quais ofereço os mais profundos agradecimentos.

Agradeço sinceramente:

Ao Prof. Dr. Amintas Fabiano de Sousa Figueiredo, pela oportunidade, pela orientação deste trabalho, pela paciência e sobre tudo amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo José Alves pela co-orientação.

Agradeço em especial ao Mestre Daniel Henriques Leal pelo inestimável apoio na orientação de todos os passos da síntese química realizada, sempre com amizade, companheirismo e profissionalismo (Departamento de Ciências Farmacêuticas, FAFAR-UFMG).

Agradeço também:

Ao Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro (Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG).

A Profa. Dra. Marinez de Oliveira Sousa (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FAFAR-UFMG).

A Profa. Dra. Josiane Nicácio Silveira (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FAFAR-UFMG).

Ao Prof. Dr. Fernão Castro Braga (Laboratório de Fitoquímica, FAFAR-UFMG).

Ao Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos (Laboratório de Alimentos, FAFAR-UFMG).

Ao Jamil S. Oliveira (Laboratório de Bioquímica, ICB-UFMG).

Ao Prof. Dr. José Danilo Ayala (Departamento de Química-UFMG).

Ao Prof. Dr. José Dias de Souza Filho (Peixe) (Departamento de Química-UFMG).

Aos colegas, amigos e companheiros do Laboratório de Enzimologia Clínica: Andreza, Fabiana, Ana Maria, Daniela e Gilmar pela alegria e satisfação de ter trabalhado com pessoas tão inteligentes e amáveis.

“A verdade prova que o tempo é o senhor dos
dois destinos, dos dois destinos.
Já que pra ser homem tem que ter a grandeza
de um menino, de um menino.”
Toni Garrido

Resumo:

O presente estudo consiste em purificar e determinar as características cinéticas da caliceína tecidual do rato (rK1), para futuramente formular inibidores enzimáticos seletivos para as caliceínas humanas. A princípio sintetizou-se e caracterizou-se o composto 4-nitrobenzamidina. A seguir, purificou-se a rK1, pelas etapas: DEAE-Sepharose (cromatografia de troca iônica) e Sepharose-aprotinina (cromatografia de afinidade). O peso molecular e a pureza da rK1 foram determinados por cromatografia em coluna de Superose 12 HR em equipamento FPLC.

Os estudos da cinética da caliceína tecidual do rato rK1 com o substrato Bz-Arg-Nan na ausência e na presença da benzamidina, 4-aminobenzamidina e 4-nitrobenzamidina indicaram que a BzA é um inibidor competitivo enquanto que a ABzA e NBzA parecem ser inibidores do tipo misto

Abstract:

The present study is to purify and determine the kinetic characteristics of the tissue calicreína mouse (rK1) to further develop selective enzyme inhibitors for human calicreínas. The principle is summed up and characterized the compound 4-nitrobenzamidina. Next, purified to rK1 by steps: DEAE-Sepharose (ion-exchange chromatography) and aprotinin-Sepharose (affinity chromatography). The molecular weight and purity of rK1 were determined by chromatography on a column of Superose 12 HR FPLC equipment. Studies of kinetics of tissue calicreína mouse rK1 with the substrate Bz-Arg-Nan in the absence and presence of benzamidina, 4-aminobenzamidina and 4-nitrobenzamidina indicated that BzA is a competitive inhibitor while ABzA and NBzA inhibitors appear to be mixed-type

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE FIGURAS.....	16
LISTA DE TABELAS.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Serino proteases.....	19
1.2. Calicreínas	22
1.3. Calicreínas plasmática e tecidual.....	24
1.4. Cininogênios.....	30
1.5. Tripsina	32
2. JUSTIFICATIVA.....	37
3. OBJETIVO GERAL.....	38
4. MATERIAIS	39
5. EQUIPAMENTOS	41
6. MÉTODOS.....	42
6.1. Purificação do metanol utilizado na síntese da 4-nitrobenzamidina	42
6.2. Síntese da 4-nitrobenzamidina	42
6.3. Purificação da calicreína tecidual do rato	44
6.3.1. Preparação do pó de glândulas submandibulares	44
6.3.2. Preparação do extrato bruto.....	44
6.3.3. Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose.....	45
6.3.4. Cromatografia em coluna de Sepharose-aprotinina	46
6.4. Determinação da concentração de proteína	48
6.4.1 Pela absorvância em 280 nm.....	48
6.4.2. Pelos métodos de BRADFORD e PETERSON	48

6.5. Estimativa do peso molecular aparente da calicreína tecidual do rato (rK1) por filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 1/30, em equipamento FPLC.....	50
6.6. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da aprotinina.....	52
6.7. Titulação do centro ativo da calicreína tecidual do rato (rK1) com a aprotinina.....	53
6.8. Método analítico cinético.....	54
6.8.1. Determinação da atividade amidásica das preparações de calicreína tecidual do rato rK1 (1) e rK1 (2).....	54
6.8.2. Cinética da inibição da atividade amidásica da rK1 pelos inibidores de serino proteases benzamidina (BzA), 4-aminobenzamidina (ABzA) e 4-nitrobenzamidina (NBzA).....	56
6.8.2.1. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da benzamidina (BzA).....	56
6.8.2.2. Determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo rK1-inibidor para a benzamidina (BzA).....	57
6.8.2.3. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da 4-aminobenzamidina (ABzA).....	58
6.8.2.4. Determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo rK1-inibidor para a 4-aminobenzamidina (ABzA).....	59
6.8.2.5. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da 4-nitrobenzamidina (NBzA).....	61
6.8.2.6. Determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo rK1-inibidor para a 4-nitrobenzamidina (NBzA).....	62
7. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS PARA A HIDRÓLISE DO SUBSTRATO Bz-ARG-NAN PELA rK1 NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DOS INIBIDORES.....	64

8. ESTIMATIVA DO VALOR DA CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO (K_i) PARA O COMPLEXOS rK1-BzA	65
9. RESULTADOS	66
9.1. Síntese da 4-nitrobenzamidina (NBzA).....	66
9.2. Caracterização da 4-nitrobenzamidina.....	66
9.2.1. Espectro de absorção da NBzA no infravermelho	66
9.2.2. Espectro de ressonância magnética nuclear da NBzA.....	67
9.2.3. Análise elementar da NBzA	67
9.2.4. Faixa de fusão	67
9.3. Purificação da calicreína tecidual do rato (rK1).....	71
9.3.1. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B	73
9.3.2. Cromatografia de afinidade, do eluato I da coluna de DEAE- Sepharose, em coluna de Sepharose-aprotinina	75
9.3.3. Cromatografia de afinidade, do eluato II da coluna de DEAE- Sepharose, em coluna de Sepharose-aprotinina	77
9.4. Critérios de pureza e peso molecular aparente da rK1	79
9.4.1. Cromatografia da rK1 em coluna de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC	79
9.4.2. Determinações dos pesos moleculares aparentes da rK1 (1) e rK1(2) eluídos da coluna de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC.....	81
9.5. Caracterização cinética da rK1	83
9.5.1. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da aprotinina.....	83
9.5.2. Titulação do centro ativo da amostra de rK1 (1) com a aprotinina.....	83
9.5.3. Titulação do centro ativo da amostra de rK1 (2) com a aprotinina.....	86
9.5.4. Absortividade molar (ϵ_M) da benzamidina (BzA)	88
9.5.5. Absortividade molar (ϵ_M) da 4-aminobenzamidina (ABzA)	89
9.5.6. Absortividade molar (ϵ_M) da 4-nitrobenzamidina (NBzA).....	90

9.6. Inibição da atividade amidásica da rK1 pelos inibidores BzA, ABzA e NBzA.....	91
10. DISCUSSÃO.....	105
10.1. Síntese e caracterização da 4-nitrobenzamidina.....	105
10.2. Purificação das amostras de rK1 (1) e rK1 (2).....	106
10.3. Critérios de pureza e peso molecular aparente da rK1(1) e rK1 (2)	107
10.4. Caracterização cinética da rK1 com o substrato Bz-Arg-Nan e com os inibidores BzA, ABzA e NBzA.....	107
10.4.1. Parâmetros cinéticos K_m e k_{cat}	107
10.4.2. Inibição da BzA	108
10.4.3. Inibição da ABzA	112
10.4.4. Inibição da NBzA	113
10.5. Comparação dos dados cinéticos com parâmetros cinéticos conhecidos da Tripsina.....	114
11. CONCLUSÕES.....	116
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

LISTA DE ABREVIATURAS

4-NAN	4-nitroanilida
ABzA	4-aminobenzamidina
An	anilina
Bz	benzoil
BzA	benzamidina
hK1	calicreína tecidual humana
Bz-Arg-Nan	N- α -benzoil-L-arginina p-nitroanilida
DMSO	dimetilsulfóxido
D-Val-Leu-Arg-Nan	D-valil-L-lencil- L-arginina 4-nitranilida
FPLC	fast performance liquid chromatography (cromatografia líquida de rápida execução)
IV	infravermelho
KIU	kallikrein inhibitor unit (unidade inibidora de calicreína)
NBzA	4-nitrobenzamidina
PM	peso molecular
rK1	calicreína submandibular de rato
RMN	ressonância magnética nuclear
SBTI	soybean trypsin inhibitor (inibidor de tripsina de soja)
Tos-Arg-OMe	N α -p-tosil-L-arginina metil éster

LISTA DE FIGURAS

Espectro 1- Espectro no IV da 4-nitrobenzamidina	68
Espectro 2- Espectro de RMN da 4-nitrobenzamidina.....	69
Espectro 2- Espectro de RMN (aumentado de 100X).....	70
Figura 1- Cromatografia de troca iônica do extrato bruto em coluna em DEAE-Sepharose	74
Figura 2- Cromatografia do eluato I, da coluna de DEAE-Sepharose em coluna de afinidade em Sepharose-aprotinina.....	76
Figura 3- Cromatografia do eluato II, da coluna de DEAE-Sepharose em coluna de afinidade em Sepharose-aprotinina.....	78
Figura 4- Cromatografia da solução de rK1 em coluna de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC	80
Figura 5- Determinações dos pesos moleculares aparentes da rK1 (1) e rK1 (2) em coluna de Superose 12 HR em equipamento FPLC	82
Figura 6-Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da aprotinina	84
Figura 7-Titulação do centro ativo da rK1 (1) com a aprotinina	85
Figura 8-Titulação do centro ativo da rK1 (2) com a aprotinina	87
Figura 9- Absortividade molar (ϵ_M) da benzamidina	88
Figura 10- Absortividade molar (ϵ_M) da 4-aminobenzamidina	89
Figura 11-Absortividade molar (ϵ_M) da 4-nitrobenzamidina.....	90
Figura 12- Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina.....	93
Figura 13- Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina.....	94

Figura 14- Gráfico de Hanes para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina.....	95
Figura 15- Gráfico de Dixon-Hanes para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina.....	96
Figura 16- Gráfico Replot $K_{m(ap)}$ para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina.....	97
Figura 17- Gráfico de Dixon-Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina.....	98
Figura 18- Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-aminobenzamidina	99
Figura 19- Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-aminobenzamidina	100
Figura 20- Gráfico de Hanes para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-aminobenzamidina	101
Figura 21- Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-nitrobenzamidina	102
Figura 22- Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-nitrobenzamidina	103

Figura 23- Gráfico de Hanes para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-nitrobenzamidina	104
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela I- Purificação da rK1	72
Tabela II-Valores de atividade amidásica encontrados na cinética dos inibidores BzA, ABzA e NBzA.....	92

1.INTRODUÇÃO

1.1. Serino proteases

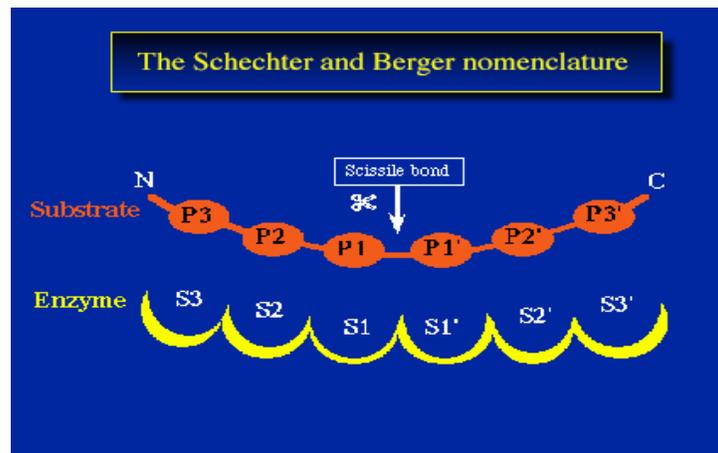
Serino proteases são enzimas que possuem um resíduo de serina ativo no seu sítio catalítico (YOUSEF *et al.*, 2003). As serino proteases catalisam um ilimitado número de reações hidrolíticas, com ampla especificidade pelo substrato (NEURATH *et al.*, 1984). Estas enzimas têm sido estudadas intensivamente nas últimas quatro décadas, resultando no acúmulo de informações de alta qualidade em relação às suas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, às suas estruturas tridimensionais, constantes cinéticas e parâmetros termodinâmicos para as reações com seus substratos e inibidores, respectivamente.

A despeito da longa investigação sobre esta família os resultados de pesquisas recentes na área das serino proteases são notáveis. As serino proteases são classificadas em 5 famílias distintas de enzimas: a da quimotripsina, da subtilisina, da serino carboxipeptidase II, do citomegalovírus humano e do componente proteolítico ClpP da protease ATP-dependente (LIAO & REMINGTON, 1992). Algumas dessas famílias foram recentemente descobertas e classificadas como a do citomegalovírus humano, que apresenta a tríade de aminoácidos catalíticos His/His/Ser em sua seqüência de aminoácidos (QIU *et al.*, 1996). Por sua vez, o componente proteolítico ClpP da protease ATP-dependente, é uma serino-protease totalmente atípica (WANG, HARTLING & FLANAGAN, 1997).

As serino proteases da família da quimotripsina participam de funções fisiológicas importantes como digestão, coagulação do sangue, fibrinólise e sistema do complemento. Proteases envolvidas nos processos digestivos, como a tripsina, têm ampla especificidade e são encontradas até em organismos

primitivos. Por outro lado, proteases envolvidas nas funções mais especializadas da coagulação sanguínea, fibrinólise e sistema do complemento têm especificidade restrita e são encontradas exclusivamente nos vertebrados (Di CERA *et al.*, 1997).

Segundo Schechter & Berger (1967), o sítio ativo de uma enzima realiza a dupla função de combinação com o substrato e catálise da reação. O sítio de ligação ao substrato é o sítio que define a especificidade da enzima. O sítio de ligação de uma enzima é composto dos subsítios (S_1 - S_n e S_1' - S_n') 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_n e P_1' - P_n'), correspondendo aos subsítios que eles ocupam.



Segundo Mares-Guia & Shaw, (1965) o sítio de especificidade da tripsina, uma serino protease típica, é constituído de um sítio aniônico ao qual ligam-se, eletrostaticamente, substratos ou inibidores através de sua carga positiva, e um sítio de ligação hidrofóbico, localizado em linha entre os sítios aniônico e catalítico, na forma de uma fenda ou bolsa, ao qual ligam-se as cadeias laterais hidrocarbonadas dos substratos ou inibidores.

As serino proteases mostram preferência para a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a uma classe particular de aminoácidos. No grupo semelhante à tripsina (trypsin-like), as proteases catalizam a hidrólise de ligações peptídicas seguindo aminoácidos básicos tais como arginina ou lisina uma vez que elas possuem um resíduo de ácido aspártico (ou ácido glutâmico) na extremidade da bolsa de ligação do substrato, subsítio S_1 , que pode formar uma forte ligação eletrostática com os resíduos básicos na posição P_1 do substrato (SCHECHTER & BERGER, 1967). As proteases semelhantes à quimotripsina (chymotrypsin-like) possuem um resíduo não polar na extremidade da bolsa de ligação do substrato, subsítio S_1 , e assim, requerem um aminoácido não polar aromático ou volumoso, tal como triptofano, fenilalanina, tirosina ou leucina na posição P_1 dos seus substratos (SCHECHTER & BERGER, 1967). As enzimas semelhantes à elastase (elastase-like) por sua vez, possuem resíduos de aminoácidos volumosos tais como valina ou treonina, em suas bolsas de ligação do substrato, subsítio S_1 , requerendo assim, pequenos resíduos hidrofóbicos na posição P_1 dos seus substratos, tais como a alanina (Di CERA *et al.*, 1997).

As calicreínas (EC 3.4.21.8) são um subgrupo de enzimas da família das serino proteases que apresentam diversas funções fisiológicas (SOUSA *et al.*, 2004).

1.2. Calicreínas

Nas décadas de 1920 e 1930 Frey, Kraut & Werle citados por Schachter *et al.*, (1980) observaram a presença de uma substância hipotensora, nas urinas do cão e do homem, e demonstraram que era possível obter um material semelhante da saliva, do plasma e de uma variedade de tecidos animais. Como o pâncreas constituía uma fonte rica dessa substância, e foi admitido como o órgão de sua origem, denominaram-na *calicreína*, a partir da palavra grega para esse órgão, *Kallikréas*.

Posteriormente, Werle *et al.*, (1937), citado por Schachter *et al.*, (1980), observaram que o plasma incubado com uma preparação de calicreína urinária humana apresentava ação contrátil sobre o íleo isolado de cobaia. A substância ativa foi denominada calidina e o seu precursor plasmático, o substrato para a calicreína, calidinogênio. Werle & Bereke, (1948) citados por Schachter *et al.*, (1980). Na mesma época Rocha & Silva *et al.* (1949) demonstraram que a tripsina e o veneno da serpente *Bothrops jararaca* liberavam, de uma fração globulínica do plasma, uma substância que reduzia a pressão arterial e provocava no íleo isolado de cobaia uma contração lenta, em relação à contração provocada pela histamina ou acetilcolina. Em virtude dessa resposta lenta, deram à substância a denominação de *bradicinina*, termo derivado das palavras gregas *bradys*, que significa “lento”, e *kinein*, que significa “mover” (bradicinina = movimento lento).

Rocha & Silva *et al.*, (1949) denominaram a bradicinina, e por analogia à denominação de calidina e calidinogênio, denominaram seu substrato de bradicininogênio.

Nesta época ficou clara a semelhança entre os sistemas calicreína-calidinogênio-calidina e tripsina ou veneno de serpente-bradicininogênio-bradicinina.

Em 1954, Schachter & Thain introduziram o termo cinina, por que pareceu-lhes de uma comparação direta, que calidina e bradicinina pertenciam a um grupo de peptídeos intimamente relacionados que eram liberados de um substrato no plasma por calicreínas, tripsina, venenos de serpentes e possivelmente por outras proteases.

Em 1960, Bhoola & Schachter introduziram o termo cininogenase como um termo genérico para todas as enzimas que liberam uma cinina e o termo cininogênio para o seu substrato.

Calicreínas (EC.3.4.21.8) são enzimas do grupo das serino proteases, com ações proteolíticas específicas e limitadas. Elas liberam um peptídeo, cinina, de um substrato, cininogênio, presente no plasma, linfa e líquido intersticial de mamíferos (SCHACHTER *et al.*, 1980). Elas catalisam a hidrólise seletiva dos cininogênios liberando os peptídeos vasoativos bradicinina ou calidina.

As calicreínas são encontradas em células glandulares, neutrófilos e líquidos biológicos (BHOOLA *et al.*, 1992). Webster (1970) classificou as calicreínas em dois grupos distintos: calicreínas glandulares ou teciduais, derivadas de fontes glandulares, e as calicreínas plasmáticas, derivadas de fontes do plasma.

A especificidade primária das calicreínas e outras serino proteases pelos resíduos de arginina e lisina é devida à presença do resíduo de ácido aspártico na posição 189, localizado no fundo da bolsa hidrofóbica, subsítio S₁, formando o sítio de especificidade, ao qual se ligam eletrostaticamente os resíduos de aminoácidos com cargas positivas de substratos ou inibidores (ASHLEY & MACDONALD, 1985). As calicreínas não possuem atividade proteolítica específica sobre substratos convencionais tais como caseína, gelatina e hemoglobina.

Os membros da família das calicreínas revelam entre si homologia de 60 a 75%, distinguindo-se de outras serino proteases, como tripsina, quimotripsina e elastase, as quais, mostram apenas 35 a 50 % de identidade na seqüência de aminoácidos (ASHLEY & MACDONALD, 1985).

1.3. Calicreínas plasmática e tecidual

A calicreína plasmática existe no plasma na forma de um precursor inativo, a pré-calicreína, sintetizada no fígado e secretada no sangue. No rato, como no homem, um único gene rKLKB e KLKB1 codifica as calicreínas plasmáticas (EC 3.4.21.34) ou fator de Fletcher, respectivamente. A pré-calicreína plasmática circula no plasma como um complexo, não covalente, ligada ao cininogênio de alto peso molecular e ao fator de Hageman ou fator XII inativo da cascata da coagulação. A pré-calicreína inativa é convertida em calicreína ativa pelo contato do plasma com superfícies eletronegativas, tais como o vidro e o colágeno (MCCONNELL & MASON, 1970). A calicreína plasmática, por sua vez, ativa o fator XII em fator XII ativo (XIIa) que desencadeia a via intrínseca da coagulação sangüínea ativando o fator XI em fator XIa, e também, ativa a pré-calicreína em calicreína. A calicreína

plasmática além de ativar a pré-caliceína, o fator XII, atua sobre o cininogênio de alto peso molecular liberando a bradicinina. O fator XIIa, por sua vez, ativa o sistema fibrinolítico transformando o plasminogênio em plasmina (BOCK *et al.*, 1985).

Caliceína tecidual é um termo genérico dado a uma grande família de serino proteases de estruturas intimamente relacionadas, que são encontradas em vários tecidos de mamíferos.

As caliceínas teciduais constituem famílias gênicas em várias espécies de mamíferos incluindo o rato, o camundongo e o homem. A família gênica das caliceínas no camundongo tem 24 membros a metade dos quais são pseudogenes (EVANS *et al.*, 1987). No rato a família gênica contém entre 15 a 20 membros (GERALD *et al.*, 1986 e WINES *et al.*, 1991). Na família das caliceínas teciduais do rato foram identificados 10 genes ativos por clonagem do mRNA (ASHLEY *et al.*, 1985a; BRADY *et al.*, 1989; BRADY & MACDONALD, 1990; MA *et al.*, 1992) ou por seqüências genômicas (CHEN *et al.*, 1988; SHAI *et al.*, 1989 e INOUE *et al.*, 1989 e WINES *et al.*, 1989 e 1991); três pseudogenes também foram identificados (GERALD *et al.*, 1986 e WINES *et al.*, 1989)

O gene do rato KLK1 (rKLK1) codifica a verdadeira caliceína tecidual cuja função é a produção proteolítica de cininas. As propriedades enzimáticas dos produtos dos outros genes sugerem que eles processam precursores polipeptídeos como tal (MACDONALD *et al.*, 1988; CLEMENTS *et al.*, 1989).

A família gênica, das calicreínas teciduais humanas, inclui 15 membros (YOUSEF & DIAMANDIS, 2002) localizados seqüencialmente no cromossoma 19q13.4. Dados recentes sugerem que pelo menos uns poucos desses genes de calicreína estão relacionados com a malignidade (YOUSEF & DIAMANDIS, 2002).

As calicreínas teciduais verdadeiras (EC 3.4.21.35) são membros de uma família de enzimas que hidrolisam o cininogênio para liberar seletivamente os peptídeos bradicinina ou lisil-bradicinina, também conhecida como calidina.

As calicreínas teciduais humana e do rato apresentam pesos moleculares entre 25000 a 49000, dependendo do método de determinação, conforme descrito por Geiger & Fritz, (1981), Miranda *et al.*, (1995) e Chao & Chao, (1988) respectivamente. Com relação à calicreína tecidual do rato os pesos moleculares aparentes descritos são: para a calicreína urinária 33000, determinado por filtração em gel de Sephadex G-150 (SILVA *et al.*, 1974) e 38000 determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (CHAO & CHAO, 1988) e para a calicreína submandibular 34000, determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (BRANDTZAEG *et al.*, 1976), 38000 determinados por filtração em gel Sephadex G-100 e eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (EL-THAHER *et al.*, 1990) e 38600 determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SOUSA, 1993).

As calicreínas teciduais apresentam microheterogeneidade com pontos isoelétricos entre 3,8 a 4,3 para a calicreína tecidual humana (GEIGER & FRITZ, 1981), 4,50, 4,90 e 5,30 para a calicreína urinária do rato (SILVA *et al.*, 1974) e 3,9, 4,0, 4,1 e 4,2 para a calicreína da glândula submaxilar do rato (BRANDTZAEG *et al.*, 1975).

A extensão da família das enzimas semelhantes à calicreína (kallikrein-like) inclui proteases de estruturas intimamente relacionadas com especificidades alteradas e papéis fisiológicos não limitados à gênese de cininas.

Membros da família das calicreínas incluem a tonina que hidrolisa o angiotensinogênio liberando a angiotensina II (BOUCHER *et al.*, 1974); as T-cininogênases de glândulas submandibulares de rato, que liberam, a T-cinina do T-cininogênio (XIONG *et al.*, 1990); a proteína ligada ao fator de crescimento epidérmico (EGF) que processa a carboxila terminal do precursor EGF ao qual permanece ligada (DRINKWATER *et al.*, 1988); a subunidade γ do fator de crescimento neural (NGF) que processa a carboxila terminal e, a ela, permanece ligada (DRINKWATER *et al.*, 1988); a subunidade α do fator de crescimento neural (NGF), que, embora enzimaticamente inativa, permanece ligada ao fator de crescimento (DRINKWATER *et al.*, 1988).

A calicreína tecidual é distinta da calicreína plasmática na origem de síntese, nas funções biológicas, nas propriedades físico-químicas tais como: peso molecular, ponto isoelétrico, caráter imunológico e também na especificidade para com os cininogênios. Elas atuam sobre os substratos sintéticos de maneira diferenciada e apresentam susceptibilidade diferenciada a vários inibidores naturais e sintéticos.

As calicreínas teciduais estão amplamente distribuídas nos tecidos de mamíferos, principalmente rim, pâncreas, estômago, mucosa intestinal, glândulas salivares, e estão sendo identificadas e isoladas em outros órgãos, tais como baço (CHAO *et al.*, 1984), pituitária (POWERS *et al.*, 1986) e músculo esquelético de rato (SHIMOJO *et al.*, 1987).

Bhoola & Ogle, (1966) e Erdős *et al.*, (1968) mostraram que uma quantidade substancial de calicreína encontra-se em grânulos na glândula submandibular do rato e na glândula salivar de cobaia, respectivamente.

Segundo Wines *et al.*, (1989), no rato, a família gênica das calicreínas é extensa estimando-se em 8-17 membros baseando-se na análise de hibridização do DNA genômico com sondas de cDNA. Por essa metodologia, caracterizaram-se seis famílias de mRNA's, denominadas: PS, S1, S2, S3, P1 e K1. O mRNA PS produz a enzima com alta atividade catalítica, denominada calicreína tecidual verdadeira, rK1. O S1 produz uma enzima homóloga à PS, mas que apresenta baixa atividade catalítica, sendo uma enzima semelhante à calicreína (kallikrein-like). O S2 produz a tonina que possui atividade catalítica sobre o angiotensinogênio, liberando a angiotensina II (BOUCHER *et al.*, 1974) e o S3 produz a enzima homóloga à tonina, semelhante à tonina (tonin-like) mas com função desconhecida.

O estudo das seqüências de aminoácidos, das calicreínas glandulares ou teciduais, revela uma homologia de 60-75% (FIEDLER & FRITZ, 1981; SWIFT *et al.*, 1982; MASON *et al.*, 1983). Essa semelhança determina que as enzimas relacionadas à calicreína são classificadas como uma subfamília, distinguindo-se das outras serino-proteases como a tripsina, quimotripsina e elastase que apresentam homologia de 30-50% na seqüência de aminoácidos. Partindo-se dessa comparação, pode-se separar, no rato, as enzimas semelhantes às calicreínas em duas subclasses: uma contendo a PS que é idêntica às calicreínas pancreática (SWIFT *et al.*, 1982), submandibular e renal do rato (LAZURE *et al.*, 1981), enzima que tem a atividade enzimática de verdadeira calicreína (GUTKOWSKA *et al.*, 1983).

A segunda enzima, S1, apresenta uma alta homologia na seqüência de aminoácidos (86%) à PS e retém os resíduos de aminoácidos importantes que determinam a especificidade enzimática das calicreínas. Esta segunda subclasse contém a enzima tonina, S2, uma serino protease, que processa “in vitro” o angiotensinogênio produzindo diretamente a angiotensina II, e uma enzima intimamente relacionada à tonina a S3 (ASHLEY & MACDONALD, 1985).

Segundo Maitra *et al.*, (1986), como as glândulas submandibulares de ratos são ricas nas enzimas calicreína e tonina, duas substâncias que produzem efeitos vasculares opostos, é possível que em algum momento, após a estimulação, a corrente sangüínea glandular dependa do equilíbrio entre elas.

Enzimaticamente, as calicreínas teciduais atuam por um peculiar mecanismo de proteólise limitada, hidrolisando duas ligações peptídicas, não semelhantes, no seu substrato natural. A calicreína tecidual humana (hK1) cataliza a hidrólise do cininogênio de baixo peso molecular nas ligações Met³⁷⁹-Lys³⁸⁰ e Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰, respectivamente, liberando o peptídeo lisil-bradicinina (calidina) enquanto que a calicreína tecidual do rato catalisa a hidrólise dos cininogênios de alto peso molecular (HMWK) (KATO *et al.*, 1985) e de baixo peso molecular (LMWK) (HAGIWARA *et al.*, 1994) liberando a bradicinina. Uma explicação para esta diferença é dada por Kato *et al.*, (1985) que afirmam que o cininogênio de alto peso molecular do rato contém a seqüência arginil-bradicinina ao invés de lisil-bradicinina.

1.4. Cininogênios

Os cininogênios, precursores das cininas, são glicoproteínas de cadeia única, pertencentes ao grupo das α_2 -globulinas, presentes no plasma e secreções de mamíferos. O sítio primário de biossíntese do cininogênio é o fígado, com pequena expressão em outros tecidos. Os cininogênios são típicas proteínas secretadas, com modificações pós-traducionais como glicosilação.

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 114000-88000, dependendo da espécie de origem e o cininogênio de baixo peso molecular (LMW), com peso molecular 68000–50000. Um terceiro tipo de cininogênio, comumente referido como T-cininogênio, com peso molecular de aproximadamente 68000, parece ser específico do rato e não é susceptível à clivagem proteolítica por calicreínas.

As calicreínas teciduais liberam bradicinina ou lisil-bradicinina (calidina) dos seus substratos naturais, os cininogênios. A calicreína tecidual humana libera a calidina dos dois tipos de cininogênios, cininogênio de alto peso molecular (HMW) e do cininogênio de baixo peso molecular (LMW) (GEIGER and FRITZ, 1981). Já a calicreína tecidual do rato libera a bradicinina dos dois cininogênios (KATO *et al.*, 1985).

Os dois substratos para as calicreínas, os cininogênios HMW e LMW são produtos de um único gene e surgem por um processamento alternativo do mRNA. No rato as duplicações genéticas resultaram em um gene K codificando para as proteínas HK e LK idênticas com as moléculas de cininogênio bovino. Portanto HK representa o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e LK o cininogênio de baixo peso molecular (LMWK), e um gene T que codifica para os T-cininogênios T-I e T-II, respectivamente

(BHOOLA *et al.*, 1992). O cininogênio HMW contém 625 resíduos de aminoácidos em 6 domínios (D1 a D6) e peso molecular de 88000 a 120000. A seqüência interna da bradicinina de 9 resíduos de aminoácidos encontra-se no domínio 4. O cininogênio LMW contém 409 resíduos de aminoácidos em 5 domínios (D1 a D5) e peso molecular de 50000 a 68000. O T-cininogênio, único do rato, apresenta 5 domínios (D1 a D5) com peso molecular de 68000. O cininogênio HMW é clivado pelas calicreínas plasmáticas e teciduais, produzindo bradicinina e calidina, respectivamente. O cininogênio LMW é um bom substrato para a calicreína tecidual e um fraco substrato para a calicreína plasmática, segundo Bhoola *et al.*, (1992). Além de atuarem como precursores da bradicinina e da calidina, os cininogênios inibem as cisteíno proteinases tais como as catepsinas B, H e I, respectivamente, segundo Müller-Esterl *et al.*, (1986).

Os cininogênios de alto e de baixo pesos moleculares mostram diferentes susceptibilidades às calicreínas teciduais e plasmáticas. Sendo que, as calicreínas plasmáticas hidrolisam preferencialmente o cininogênio de alto peso molecular (HMW), liberando bradicinina (HABERMAN *et al.*, 1970), enquanto que as calicreínas teciduais hidrolisam preferencialmente o cininogênio de baixo peso molecular (LMW), liberando a calidina, lisil-bradicinina (MÜLLER-ESTERL *et al.*, 1986). Segundo Kato *et al.*, (1985), as calicreínas teciduais (glândulas submandibulares e urinária) do rato hidrolisam os cininogênios de baixo e de alto pesos moleculares, liberando a bradicinina. Isto acontece porque os cininogênios de HMWK e LMWK contêm a seqüência arginil-bradicinina.

1.5. Tripsina

A tripsina (EC 3.4.2.1.4) é uma das serino proteases mais 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 especificidade da tripsina é atribuída às ligações peptídeas envolvendo as carboxilas dos aminoácidos básicos arginina e lisina. O seu centro ativo é constituído de um sítio aniônico, ao qual ligam-se substratos ou inibidores hidrofóbicos que acomodam a cadeia hidrocarbonada dos substratos ou inibidores, e o sítio catalítico propriamente dito, que é constituído da tríade catalítica His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ e Asp¹⁰². Vários substratos sintéticos, ésteres e amidas, têm sido utilizados em estudos cinéticos com a tripsina para avaliar seu comportamento catalítico, tais como: N- α -benzoil-L-arginina-etil éster (Bz-Arg-OEt) (OLIVEIRA *et al.*, 1993), Tosil-L-arginina-metil éster (Tos-Arg-OMe) (MAGALHÃES-ROCHA *et al.*, 1980), N- α -benzoil-L-arginina-nitroanilida (Bz-Arg-Nan) (MARES-GUIA & FIGUEIREDO, 1970) e D-valil-L-leucil-L-arginina-4-nitroanilida (Val-Leu-Arg-Nan) (OLIVEIRA *et al.*, 1993)

A tripsina, assim como, a trombina e as calicreínas teciduais e plasmáticas, são susceptíveis, em vários graus, a alguns inibidores naturais de proteases (SCHACHTER *et al.*, 1980).

Mares-Guia & Shaw, (1965) mostraram a inibição competitiva da atividade amidásica da tripsina por amidinas e guanidinas substituídas. Dentre as amidinas, eles utilizaram a acetamidina, a fenilcetamidina, a cicloexilamidina, a benzamidina e a 4-aminobenzamidina. Entre as amidinas a 4-aminobenzamidina foi o composto que apresentou melhor inibição, seguida da benzamidina. As guanidinas utilizadas foram a ciclofenilguanidina e fenilguanidina.

A molécula da benzamidina é o modelo para as cadeias laterais dos aminoácidos Arg e Lys, que correspondem a especificidade primária da enzima tripsina. Apresentando um pK_a de 11,6, a benzamidina comporta-se da mesma maneira que os aminoácidos Arg e Lys, ou seja, permanece completamente protonada no pH fisiológico (REICH *et al.*, 1975).

O centro reativo da tripsina e a maneira como ele complexa-se com a benzamidina foram caracterizados por cristalografia de raios X, demonstrados por Marquart *et al.*, (1983). A figura abaixo representa a caracterização do complexo benzamidina-tripsina, demonstrando a tríade catalítica da tripsina: His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵. (representado com a BzA roxo)



Pode-se notar que a benzamidina liga-se diretamente aos sítios aniônico e hidrofóbico da tripsina, dessa maneira, bloqueando a ligação do substrato a estes sítios. No sítio aniônico do centro ativo da enzima, acontece a ligação do nitrogênio amidínico positivamente carregado ao carboxilato do aminoácido Asp¹⁸⁹, de maneira simétrica ao substrato. O anel benzênico da molécula da benzamidina posiciona-se dentro do sítio hidrofóbico estabelecendo ligações com os resíduos de aminoácidos constituintes do sítio. Dessa maneira, um substituinte na posição C-4 do anel da benzamidina fica fora do sítio hidrofóbico, dependendo do substituinte, podendo ou não estabelecer ligações que aumentam ou dificultam a inibição, em relação à inibição pela benzamidina (TALHOUT & ENGBERTS, 2001).

Mares-Guia et al., (1977) descreveram a inibição competitiva da tripsina por amidinas. Estudaram a inibição competitiva da tripsina por benzamidinas 4-substituídas. Verificaram que a 4-aminobenzamidina foi o melhor inibidor e que a 4-nitrobenzamidina foi o inibidor de pior resultado. Os autores interpretaram os seus resultados afirmando que eles estão de acordo com um modelo que, por transferência intramolecular de carga, os substituintes doadores de elétrons, como a 4-aminobenzamidina, adquirem configuração dipolar, com uma carga parcial δ^+ no substituinte e uma carga parcial δ^- no anel aromático. Já os substituintes retiradores de elétrons, como a 4-nitrobenzamidina, geram um dipolo de polaridade oposta, com uma carga parcial δ^- no substituinte e uma carga parcial δ^+ no anel aromático. Assim, compostos como a 4-aminobenzamidina e a 4-nitrobenzamidina são capazes de interagirem de modos diferentes com a tripsina, de acordo com sua carga parcial. A 4-aminobenzamidina é capaz de interagir com um determinado sítio da enzima reforçando a ligação do inibidor ao centro ativo da enzima. Por outro lado o composto 4-nitrobenzamidina gera uma repulsão dipolo - dipolo entre os substituintes através de sua carga parcial enfraquecendo assim a ligação do inibidor ao centro ativo da enzima.

Como o sítio ativo das calicreínas glandulares e teciduais é semelhante ao sítio ativo da tripsina, ou seja, é constituído de um subsítio aniônico, responsável pela ligação do substrato através da atração eletrostática a seu nitrogênio carregado positivamente, um subsítio hidrofóbico, que liga a cadeia lateral carbonada dos resíduos arginil ou lisil, e o sítio catalítico propriamente dito, que contém um resíduo seril e histidil. (MARES-GUIA & DINIZ, 1970).

Baseado nestes dados, foi proposto o presente projeto de pesquisa que visa estudar as interações das amidinas: benzamidinas, 4-aminobenzamidinas e 4-nitrobenzamidina com a calicreína tecidual do rato. O estudo é a continuação do trabalho realizado por Souza, (1993), que utilizou as moléculas benzamidina e 4-aminobenzamidina.

A utilização da 4-nitrobenzamidina foi devida à peculiar característica da molécula que apresenta carga parcial δ^- no grupo nitro e carga parcial δ^+ no grupo amidínico.

2. JUSTIFICATIVA

O sistema caliceína-cinina é um sistema enzimático muito importante para os seres vivos, inclusive o homem. Ele participa de processos fisiológicos e fisiopatológicos tais como: controle da pressão sangüínea, coagulação do sangue, fibrinólise, hipertensão e processos tromboembólicos.

As caliceínas são enzimas-chave neste sistema. Por isso, o aprofundamento dos conhecimentos sobre as propriedades das caliceínas tem um grande interesse científico. Das caliceínas, as teciduais são as mais fáceis de serem obtidas no estado puro e, assim, de serem melhor caracterizadas. Das caliceínas teciduais, a da glândula submandibular do rato é uma das mais fáceis de ser isolada e purificada. Além disso, a caliceína tecidual do rato tem algumas propriedades enzimáticas semelhantes às da caliceína plasmática humana. Por isso, a caliceína tecidual do rato pode ser utilizada como exemplo, como modelo de estudo para a caracterização de inibidores da caliceína plasmática humana.

Estes fatos motivaram a elaboração deste projeto de pesquisa.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a inibição da calicreína tecidual do rato pelos inibidores de serino proteases benzamidina, 4-aminobenzamidina e 4-nitrobenzamidina, respectivamente. Comparar os resultados com dados publicados para a inibição da tripsina.

3.1. Objetivos específicos

3.1.1. Sintetizar e caracterizar quimicamente a 4-nitrobenzamidina.

3.1.2. Purificar a calicreína tecidual de rato (rK1) partindo-se do pó liofilizado de glândulas submandibulares de rato.

3.1.3. Realizar experiências cinéticas utilizando a calicreína tecidual do rato e o substrato Bz-Arg-Nan na ausência e na presença de concentrações crescentes de benzamidina, 4-aminobenzamidina e de 4-nitrobenzamidina, respectivamente.

3.1.4. Determinar as constantes cinéticas K_m e k_{cat} da rK1 para o substrato Bz-Arg-Nan e as constantes cinéticas K_i para os inibidores benzamidina, 4-aminobenzamidina e 4-nitrobenzamidina.

3.1.5. Comparar os resultados obtidos com dados publicados da literatura para a tripsina.

4. MATERIAIS

- 2- Metoxietanol (Baker)
- Acetato de etila (Synth)
- Ácido acético glacial (Anidrol Produtos Químicos Ltda, Brasil)
- Ácido clorídrico (Synth)
- Ácido fosfórico a 85% v/v (Quimex, Brasil)
- Albumina de soro bovino (Sigma, USA)
- Álcool etílico absoluto (Synth)
- Álcool metílico (Synth)
- Aprotinina (Sigma, USA)
- Azida sódica (Sigma, USA)
- Azul Brilhante de Comassie G-250 (Riedel de Hæn, Alemanha)
- Sepharose ativada pelo brometo de cianogênio (Sigma, USA)
- Benzamidina (Synth)
- Cloreto de amônio (Grupo Química, Brasil)
- Cloreto de sódio (Cromato Produtos Químicos Ltda, Brasil)
- DEAE-Sepharose CL 6B (Pharmacia Biotech AB, Suécia)
- Dimetilsulfóxido (Merck Schuchardt, Alemanha)
- Éter etílico (Cinética, Brasil)
- Fosfato monobásico de sódio (Synth)
- Glicina (Synth)
- Hidróxido de sódio (Sigma, USA).
- Inibidor de tripsina de soja (SBTI) (Sigma, USA).
- Iodo ressublimado (Synth)
- Magnésio metálico (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)
- N- α -benzoil-L-arginina-p-nitroanilida: Bz-Arg-Nan (Sigma, USA).
- 4-Aminobenzamidina (Synth)

- 4-Nitrobenzoni-trila (Aldrich Chemical Company, USA).
- Papel indicador universalindikator pH 0-14 (Merck Schuchardt, Alemanha).
- Pó de glândulas submandibulares provenientes de ratos wistar adultos.(ICB-UFMG, Brasil)
- Sepharose-aprotinina (Sigma, USA).
- Sódio metálico (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)
- Trasylol® (Bayer, Brasil)

5. EQUIPAMENTOS

- Aparelho de ponto de fusão (Microquímica PF- 301, Brasil)
- Aparelho de ultrafiltração (AMICON-USA)
- Aparelho de rotavapor (Fisatom modelo 558)
- Balança analítica (Mettler Toledo KG204)
- Banho-maria (Fanem Unitemp 116 B, Brasil)
- Centrifuga (Hitachi CR 21, Japão.)
- Coletor de frações (Bio Rad modelo 2110, USA)
- Deionizador mili Q (Milipore, USA)
- Espectrofotômetro (Shimadzu UV-160A, Japão)
- Potenciômetro (Micronal B374, Brasil)
- Rotavapor (Büch Waterbach B-480)
- Infravermelho (Shimadzu IR-400, Japão)
- Aparelho de RMN-H (Bruker Avance DPX 200)
- Aparelho de análise elementar (C, H, N-2400 Perkin Elmer)
- Equipamento de FPLC (Pharmacia Fine Chemical Inc, Suécia)

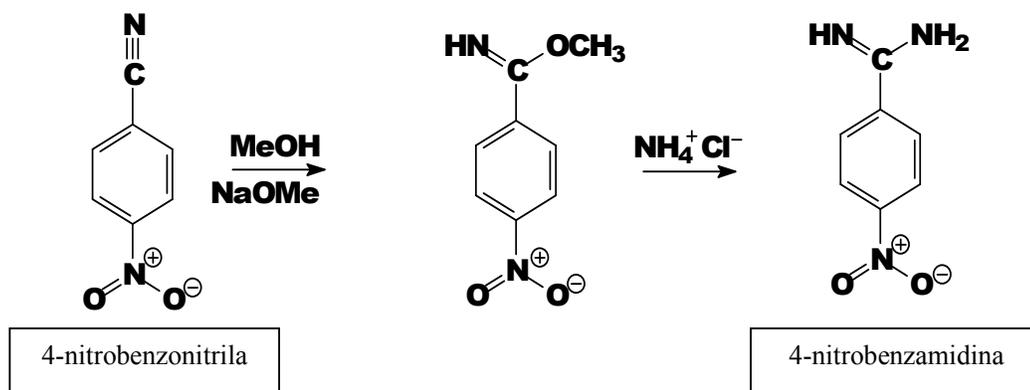
6. MÉTODOS

6.1. Purificação do metanol utilizado na síntese da 4-nitrobenzamidina

A purificação do metanol foi feita segundo metodologia descrita em Vogel, (1977).

6.2. Síntese da 4-nitrobenzamidina (NBzA)

A síntese da NBzA baseia-se no seguinte esquema de reações:



Em um balão de 100 mL de fundo redondo foi preparado o metóxido de sódio, adicionando-se 0,008 g (0,34 mmol) de sódio metálico a 10 mL de metanol previamente purificado. A essa solução adicionou-se 0,503 g (3,39 mmol) de 4-nitrobenzotrile e a mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24 horas.

Em seguida adicionaram-se 0,118 g (2,21 mmol) de cloreto de amônio, e a mistura foi aquecida a 55°C por 1 hora, mantendo-se a agitação magnética. A seguir o solvente foi removido em evaporador rotatório.

O sólido obtido foi transferido para um erlenmayer de 100 mL e adicionaram-se 20 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, até atingir o

pH 10, medido com fita de papel indicador Universalindikator pH 0-14. Observou-se a formação de um precipitado.

O precipitado foi recolhido em funil de Buchner utilizando-se trompa de vácuo. O sólido obtido foi transferido para um recipiente âmbar colocado em dessecador. Obtendo-se 0,39 g de amidina com rendimento bruto de 70%.

O produto bruto foi dissolvido em cerca de 3 mL de solução 3 mol/L de ácido clorídrico e a solução foi transferida para um funil de separação de 250 mL. A fase aquosa foi submetida à extração com 50 mL de acetato de etila. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes.

Após a última separação de fases, adicionou-se à fase aquosa 3 mL de solução de hidróxido de sódio 3 mol/L, com resfriamento em gelo, elevando-se o pH para 13. Ocorreu a formação de um precipitado e a mistura foi deixada por cerca de 15 minutos em repouso.

O precipitado foi filtrado em funil de Buchner sob vácuo produzido por trompa, o sólido foi lavado no funil com água destilada e deixado secar à temperatura ambiente. O sólido obtido foi pesado e transferido para um recipiente âmbar que foi colocado em dessecador. Obteve-se 0,37 g de 4-nitrobenzamidina (2,37 mmol) correspondendo ao rendimento de 66%.

6.3. Purificação da calicreína tecidual do rato

6.3.1. Preparação do pó de glândulas submandibulares

A calicreína tecidual de rato foi purificada segundo Sousa, (1993). O protocolo de purificação envolveu quatro etapas, descritas a seguir.

6.3.2. Preparação do extrato bruto

Sob refrigeração de 11-12 graus Celsius, dois gramas do pó de glândulas submandibulares de rato foram adicionados 15 mL de éter etílico para desengordurar, e a mistura foi agitada, manualmente, com um bastão de vidro durante 5 minutos e filtrada à vácuo. A massa glandular foi, novamente, misturada com 15 mL de éter etílico, agitada com bastão de vidro durante 5 minutos e filtrada a vácuo. A massa glandular depois de seca à temperatura ambiente pesou 1,8 g.

Esse material foi misturado com 20 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo 2-metoxietanol (3,8 M) e 0,05% de azida de sódio (p/v). A mistura foi mantida, sob agitação branda, por 4 horas a 4°C.

Em seguida, esta mistura foi centrifugada a 9000 rpm (9,37 x g) durante 30 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido e denominado extrato bruto.

O extrato bruto foi submetido às dosagens de proteínas segundo Bradford (1976) e Peterson (1983) descrito por Sousa, (1993) e de atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan segundo Erlanger et al., (1961), descrito por Sousa, (1993). A seguir, o extrato bruto foi dializado contra o tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo azida de sódio a 0,05% (p/v) a 4°C.

6.3.3. Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose

O extrato bruto dializado (57,00 mL correspondendo a 44,90 mg em proteínas) foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna (9,0 x 2,8 cm) de DEAE-Sepharose, equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, contendo azida de sódio 0,05% (p/v) e mantida à temperatura de 4°C.

A seguir, a coluna foi lavada exaustivamente com o tampão de equilíbrio, coletando-se frações de 4,5 mL.

A eluição das proteínas combinadas ao gel, foi realizada pelo método passo a passo aplicando-se consecutivamente à coluna os seguintes tampões: fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo cloreto de sódio 125 mM; fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo cloreto de sódio 250 mM; fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo cloreto de sódio 500 mM e fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo cloreto de sódio 750 mM, respectivamente. Todos os tampões continham azida de sódio a 0,01% (p/v).

Durante a eluição foram coletadas frações de 3,3 mL. A coluna, mantida a 4°C foi desenvolvida com fluxo de 23 mL/hora.

As frações coletadas foram submetidas à análise do teor de proteínas pela leitura da absorvância em 280 nm e à determinação da atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan como descrito por Sousa (1993). As frações com atividade amidásica foram ajuntadas em duas amostras denominadas eluatos I e II, respectivamente. O eluato I constituído das frações 95 a 142 e o eluato II constituído das frações 143 a 170. O eluato I mediu 155 mL e o eluato II 47 mL, respectivamente. Os dois eluatos foram concentrados por ultrafiltração para 28,0 mL e 23,0 mL, respectivamente. Os eluatos I e II foram submetidos às dosagens de proteínas segundo Bradford (1976) e Peterson (1983) e de atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan segundo Sousa (1993).

6.3.4. Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina

O gel de Sepharose-aprotinina foi preparado segundo Geiger & Fritz (1980). Para tanto, 15 g de Sepharose-4B ativada por brometo de cianogênio foram lavados, em funil de vidro sinterizado, com 3,3 L de solução de HCl 1 mM. Em seguida, 375 mg de aprotinina foram dissolvidas em 39 mL de solução de NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3, contendo NaCl 0,5 M. Esta solução de aprotinina foi adicionada ao gel de Sepharose e a mistura agitada, brandamente, durante 2 horas à temperatura ambiente. Esta mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado. Para bloquear os grupos ativos da Sepharose, que não reagiram com a aprotinina, o gel foi misturado a 65 mL de solução de etanolamina 1 M. Esta mistura foi agitada, brandamente, durante 2 horas à temperatura ambiente. A seguir, o gel de Sepharose-aprotinina foi lavado, em funil de vidro sinterizado, com 3,5 L de solução de NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3 contendo NaCl 0,1 M. O gel foi removido do funil e adicionado ao tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, contendo NaCl 0,75 M e azida de sódio 0,01% (p/v), e empacotado na coluna que era mantida a 4°C.

Cada eluato foi submetido, separadamente, à cromatografia de afinidade em coluna (6,5 x 2,8 cm) empacotada com o gel de Sepharose-aprotinina, equilibrada em tampão glicina-NaOH 0,1 M, contendo cloreto de sódio 0,75 M, e azida de sódio 0,05% (p/v), pH 9,0, mantida à temperatura de 4°C.

O eluato I no volume de 28,0 mL, correspondendo a 1,80 mg de proteínas, proveniente da etapa anterior foi aplicado à coluna. Em seguida, a coluna foi lavada exaustivamente com o tampão de equilíbrio, coletando-se frações de 5,0 mL.

A calicreína tecidual foi eluída aplicando-se à coluna o tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 3,5, contendo cloreto de sódio 1 M e azida de sódio 0,05% (p/v). Frações de 2,5 mL eram coletadas em tubos contendo 0,5 mL de tampão Tris 2,0 M, pH 8,5. A coluna foi desenvolvida com o fluxo de 38,0 mL/hora.

As frações eluídas foram analisadas pela leitura da absorvância em 280 nm e pela determinação da atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan. As frações ativas (64 a 80) foram agrupadas e a solução resultante mediu 40 mL que foram concentrados, por ultrafiltração, para o volume de 13,0 mL, denominado rK1 (1).

O eluato II no volume de 23,0 mL, correspondendo a 1,6 mg de proteínas, obtido na etapa anterior também foi aplicado à coluna. Em seguida, a coluna foi lavada exaustivamente com o tampão de equilíbrio, coletando-se frações de 5,0 mL.

A calicreína tecidual foi eluída com tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 3,5, contendo cloreto de sódio 1 M, azida de sódio 0,05% (p/v), coletando-se frações de 2,5 mL em tubos contendo 0,5 mL de tampão Tris 2,0 M, pH 8,5. A coluna foi desenvolvida com o fluxo de 38,0 mL/hora.

As frações eluídas foram analisadas pela leitura da absorvância em 280 nm e pela determinação da atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan. As frações ativas (78 a 96) foram ajuntadas e a solução resultante mediu 45 mL que foram concentrados, por ultrafiltração, para o volume de 9,5 mL, denominado rK1 (2).

As amostras rK1 (1) e rK1 (2) foram submetidas às dosagens de proteínas segundo Bradford (1976) e Peterson (1983) e de atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan conforme descrito por Sousa, (1993).

6.4. Determinação da concentração de proteínas

6.4.1. Pela absorvância a 280 nm no eluato

As concentrações relativas de proteínas nas frações cromatográficas eram estimadas pela leitura da absorvância em 280 nm traçando-se os perfis cromatográficos correspondentes.

6.4.2. Pelos métodos de BRADFORD e PETERSON

As dosagens de proteínas nas soluções eram realizadas pelos métodos de Bradford (1976) e Peterson (1983); adaptado, usando-se a albumina de soro bovino como padrão, como descrito por Sousa, (1993).

Para a preparação do reagente de cor dissolviam-se 100 mg de Azul Brillante de Coomassie G-250 em 50 mL de etanol a 95%. Em seguida, adicionavam-se à solução 100 mL de ácido fosfórico a 85% e completava-se o volume para um litro com água destilada. A solução era filtrada e armazenada a 4°C. Essa solução conserva-se durante dois meses, se armazenada a 4°C.

Para as dosagens, em triplicatas, a 0,5 mL da amostra adicionavam-se 2,5 mL da solução do reagente de cor. A mistura era agitada e deixada em repouso 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, liam-se as absorvâncias das misturas de reação em 595 nm.

Como padrões, usavam-se duas soluções de albumina de soro bovino nas concentrações de 0,025 e 0,050 mg /mL, respectivamente. O resultado da concentração da amostra deveria estar entre os valores dos dois padrões. Quando isso não acontecia usavam-se padrões de concentrações diferentes. A concentração de proteínas nas amostras era determinada utilizando-se a equação (1.0) descrita por Peterson (1983).

$$P = (b.A / 1-a.A) \quad (1.0)$$

sendo:

$$a = A^{-1} - b.P^{-1} \quad (1.1)$$

$$b = (A_1^{-1} - A_2^{-1}) / (P_1^{-1} - P_2^{-1}) \quad (1.2)$$

$$\bar{A}^{-1} = (\bar{A}_1^{-1} + \bar{A}_2^{-1}) / 2 \quad (1.3)$$

$$P^{-1} = (P_1^{-1} + P_2^{-1}) / 2 \quad (1.4)$$

onde:

P = concentração da amostra em proteína

A = absorvância em 595 nm

A₁ = absorvância do padrão de menor concentração

A₂ = absorvância do padrão de maior concentração

P₁ = concentração do padrão de menor concentração (mg/ml)

P₂ = concentração do padrão de maior concentração (mg/ml)

6.5. Estimativa do peso molecular aparente da calicreína tecidual do rato (rK1) por filtração molecular em coluna de Superose 12 HR 1/30, em equipamento FPLC.

Os pesos moleculares aparentes das preparações da calicreína tecidual do rato rK1 (1) e rK1 (2) purificadas foram estimados por cromatografia em coluna de gel de Superose 12 HR 1/30 (10,0 x 300,0 mm), em equipamento FPLC.

A coluna de gel, com volume de 24,0 mL, foi eqüilibrada com tampão fosfato de sódio 50,0 mM, pH 6,5, contendo cloreto de sódio 0,1 M, desenvolvida com fluxo de 0,5 mL/min. Utilizaram-se os seguintes padrões de peso molecular:

Padrões.....	PM
Aprotinina (Sigma,USA).....	6500
Citocromo c (Sigma,USA)	12400
Tripsinogênio (Sigma,USA).....	25000
Ovoalbumina (Sigma,USA).....	45000
Soroalbumina bovina (Sigma,USA)	66000
Desidrogenase alcoólica (Sigma,USA).....	150000
Beta amilase (Sigma,USA).....	205000
Dextrana azul (Sigma,USA).....	2000000

As soluções de rK1 (1) e rK1 (2) aplicadas à coluna continham 50,0 µg de proteína em um volume de 200,0 µL.

A cromatografia do padrão de dextrana azul serviu para calcular o volume de exclusão (V_o) da coluna. As cromatografias dos padrões permitiram calcular os seus respectivos volumes de eluição (V_e) e o volume total (V_t) do gel foi calculado a partir do conhecimento do diâmetro interno da coluna e da altura do leito de gel na coluna.

As cromatografias das amostras de calicreína rK1 (1) e rK1 (2) permitiram calcular seus respectivos volumes de eluição (V_e).

Os valores de K_{av} para os padrões e para as preparações de rK1 (1) e rK1 (2) foram calculados utilizando-se a equação:

$$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o) \quad (1.5)$$

A seguir, foi desenhada uma curva padrão, locando-se na ordenada os valores de K_{av} , para as proteínas padrões, e na abscissa os valores dos logaritmos dos seus respectivos pesos moleculares.

Os pesos moleculares aparentes das duas preparações de calicreína, rK1 (1) e rK1 (2), foram determinados por interpolação gráfica de seus valores de K_{av} na curva padrão.

6.6. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da aprotinina

A determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da aprotinina foi realizada como descrito a seguir: preparou-se uma solução estoque de aprotinina (PM 6500), não dessecada, pesando-se 4,3 mg que foram dissolvidas em 4,3 mL de água destilada mili Q cuja concentração era de 0,662 mM. Partindo-se dessa solução foram preparadas, em triplicatas, soluções de uso nas concentrações de 6,15 μ M a 30,76 μ M.

A solução estoque de aprotinina foi submetida à leitura de absorvância entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm, para a determinação do comprimento de onda no qual ocorre a absorção máxima (λ_{max}) que foi 253 nm. A seguir, leram-se as absorvâncias das soluções de uso de aprotinina neste comprimento de onda. Em seguida, desenhou-se um gráfico locando-se na ordenada as absorvâncias e na abscissa os valores das concentrações das soluções de uso, respectivamente. A inclinação da reta obtida forneceu o valor da absorvidade molar da aprotinina.

6.7. Titulação do centro ativo da calicreína tecidual do rato (rK1) com a aprotinina

A concentração molar, em centro ativo, da rK1 foi determinada por titulação direta com o inibidor de calicreína aprotinina.

Para tanto, as misturas de incubação, em triplicatas, consistiam de 100 μL da amostra de rK1, diluída 100 vezes com o tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0 contendo azida de sódio a 0,01% (p/v) e 100 μL de uma solução de uso de aprotinina preparada por diluições da solução estoque 23,17 nM. As misturas eram pré-incubadas a 37°C durante 10 minutos e a seguir adicionavam-se 400 μL da solução do substrato Bz-Arg-Nan (0,158 mM) no tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, contendo azida de sódio a 0,05% (p/v). As misturas de incubação eram novamente incubadas durante 30 minutos. As reações eram paralisadas pela adição de 100 μL de solução de ácido acético a 60% (v/v). As concentrações de aprotinina nas incubações variaram de 17,6 nM a 141,0 nM, respectivamente. A seguir, as absorvâncias das misturas de incubação eram lidas em 410 nm.

A seguir, desenhou-se um gráfico locando-se na ordenada os valores de velocidade (atividade amidásica) e na abscissa os valores das respectivas concentrações de aprotinina. As concentrações molares das soluções de aprotinina foram determinadas espectrofotometricamente utilizando-se a sua absorvidade molar (E_M) de $8299,93 \pm 360$ anteriormente determinada.

Os valores dos pontos da reta foram submetidos à análise estatística utilizando-se a fórmula (1.6) de correlação de dados apresentada a seguir:

$$r = \frac{n\sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{[n\sum x_1^2 - (\sum x_1)^2] [\sum y_1^2 - (\sum y_1)^2]^{1/2}} \quad (1.6)$$

A seguir, foram calculadas a regressão linear utilizando-se as fórmulas (1.7) e (1.8):

$$a = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2} \quad (1.7)$$

$$b = y(\text{média}) - x(\text{média}) \quad (1.8)$$

A concentração de aprotinina (x) que inibe completamente a rK1 foi calculada pela equação da reta.

$$Y = ax + b \quad (1.9)$$

A concentração molar da rK1 foi calculada a partir da concentração de aprotinina encontrada admitindo-se uma interação equimolar entre a rK1 e a aprotinina.

6.8. Método analítico cinético

6.8.1. Determinação da atividade amidásica das preparações de calicreína tecidual do rato rK1 (1) e rK1 (2)

A atividade amidásica das preparações de rK1 (1) e rK1 (2) com o substrato sintético Bz-Arg-Nan era realizada segundo o método de Erlanger *et al* (1961), como descrito por Sousa (1993).

Inicialmente o substrato era deixado no dessecador, a vácuo, durante aproximadamente 72 horas para desumidificar. A seguir, preparava-se uma solução estoque dissolvendo-se 60 mg do substrato Bz-Arg-Nan (PM = 434,9) em 5 mL de dimetilsulfóxido. A concentração desta solução era de 27,60 mM. A partir dessa solução preparava-se uma solução de uso diluindo-se a solução estoque 50 vezes com tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, contendo azida de sódio a 0,01% (p/v).

Preparavam-se quatro misturas de incubações designadas como: amostra (A); amostra com Trasylol® (A+T); controle da amostra (CA) e

controle do substrato (CS), que continham:

A: 100 μL da amostra e 100 μL do tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0. A+T: 100 μL da amostra e 100 μL de Trasylol® na concentração de 1000 unidades inibidoras de calicreína (KIU)/mL. CA: 100 μL da amostra e 500 μL do tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0 e CS: 200 μL de tampão glicina-NaOH 0,2 M pH 9,0. Essas misturas, em triplicatas, eram pré-incubadas a 37°C durante 10 minutos para equilibrar a temperatura. A seguir, adicionavam-se 400 μL da solução do substrato Bz-Arg-Nan na concentração de 0,551 mM e as misturas eram, novamente, incubadas a 37°C durante 30 minutos. As reações eram paralisadas adicionando-se às misturas 100 μL de solução de ácido acético a 60% (v/v).

Em seguida, lia-se as absorvâncias em 410 nm da 4-nitroanilina liberada nas misturas incubação. As absorvâncias eram convertidas em velocidade de hidrólise do substrato utilizando-se a equação:

$$v = \Delta A_{410} (1/E_M) (1/t) (1/F) (1,1) \quad (1.6)$$

Onde:

ΔA_{410} = valor real da absorvância. O valor real da absorvância era o valor da absorvância da mistura (A) menos o valor da absorvância encontrada na incubação da amostra (A+T), menos o valor do controle da amostra (CA).

E_M = absortividade molar da 4-nitroanilina em 410 nm (8800 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH 9);

t = tempo de incubação em minutos;

F = quantidade de proteína (mg/mL) das amostras na incubação. (Utilizada apenas nos cálculos da atividade amidásica específica)

1,1 = fator de correção do volume da incubação para o volume final da leitura de absorvância. (700 μL / 600 μL).

6.8.2. Cinética da inibição da atividade amidásica da rK1 pelos inibidores de serino proteases benzamidina (BzA), 4-aminobenzamidina (ABzA) e 4-nitrobenzamidina (NBzA)

A inibição da atividade amidásica da rK1, com o substrato sintético Bz-Arg-Nan, pelos inibidores BzA, ABzA e NBzA foi realizada segundo protocolo descrito por Sousa, (1993).

Para tanto, foram determinadas as absorvidades molares (ϵ_M) para cada um dos inibidores. Os valores das absorvidades molares serão utilizados nas determinações espectrofotométricas das concentrações de suas soluções estoques.

6.8.2.1. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da benzamidina (BzA)

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de BzA pesando-se 64,5 mg e dissolvendo-as em 5 mL do tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0. A concentração da solução foi de 82,36 mM. Partindo-se dessa solução foram preparadas, no tampão, em triplicatas, soluções de uso de concentrações 5,15 mM a 30,88 mM, respectivamente.

A solução estoque de BzA foi submetida à leitura de absorvância entre os comprimentos de onda 200 a 400 nm para a determinação do comprimento de onda em que ocorre a absorção máxima (λ_{max}) que foi em 284 nm. A seguir, leram-se as absorvâncias das soluções de uso neste comprimento de onda. Em seguida, desenhou-se um gráfico locando-se na ordenada os valores de absorvância e na abscissa os valores das concentrações das soluções, respectivamente. A inclinação da reta obtida forneceu o valor da absorvidade molar da BzA.

6.8.2.2. Determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo rK1-inibidor para a benzamidina (BzA)

O substrato utilizado foi o Bz-Arg-Nan dissolvido em dimetilsulfóxido produzindo uma solução estoque de concentração 27,60 mM. Com esta solução preparava-se uma solução, 10 vezes diluída no tampão, cuja concentração era de 2,76 mM. A partir desta preparavam-se soluções de uso nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 μ M, respectivamente.

As concentrações molares reais do substrato foram determinadas após hidrólise total com tripsina. (Doação do Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG).

Preparou-se, também, uma solução estoque de BzA dissolvendo-se 108 mg em 50 mL do tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0. A concentração desta solução era de 13,79 mM. A partir dessa solução foram preparadas, por diluição no tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, soluções de uso nas concentrações: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mM, respectivamente.

As incubações eram realizadas segundo o seguinte protocolo:

Tubo	Tampão (μ L)	rK1 (μ L)	BzA (μ L)	Pré-incubação 5 min	Substrato (μ L)	Incubação 15 min	HAc (μ L)
CS	100	—	—		300		50
rK1	50	50	—		300		50
rK1+ BzA	—	50	50		300		50

CS = controle do substrato, HAc = ácido acético a 60% (v/v).

Para cada concentração do substrato, as misturas de incubação rK1 + BzA continham concentrações crescentes do inibidor BzA. As misturas eram pré-incubadas durante 5 minutos a 37°C para a homogeneização da temperatura, de acordo com o protocolo acima. Em seguida, adicionava-se o substrato e incubava-se, novamente, durante 15 minutos a 37°C. As reações eram paralisadas pela adição de ácido acético a 60% (v/v).

Foram feitas incubações, em triplicatas, na presença de BzA nas concentrações: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mM, respectivamente. A seguir, liam-se as absorvâncias em 410 nm, das misturas de incubação, que eram convertidas para velocidade de reação ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) por meio da equação:

$$v = \Delta_{A410} (1/8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}) (1/15 \text{ min}) (1,1/101,7\text{nM})$$

Onde:

8800 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ = absortividade molar da 4-nitroanilina

15 min = tempo de incubação

1,1 = fator de correção para o volume (volume da incubação, dividido pelo volume final da preparação)

101,7 nM = concentração da enzima na incubação

6.8.2.3. Determinação da absortividade molar (ϵ_M) da 4-aminobenzamidina (ABzA)

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de ABzA pesando-se 61,9 mg e dissolvendo-as em 5 mL do tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0. A concentração da solução foi de 59,26 mM. Partindo-se dessa solução foram preparadas, no tampão, em triplicatas, soluções de uso de concentrações 5,92 mM a 47,40 mM, respectivamente.

A solução estoque de ABzA foi submetida à leitura de absorvância entre os comprimentos de onda 200 a 400 nm para a determinação do comprimento de onda em que ocorre a absorção máxima (λ_{max}) que foi em 293 nm. A seguir, leram-se as absorvâncias das soluções de uso neste comprimento de onda. Em seguida, desenhou-se um gráfico locando-se na ordenada os

valores de absorvância e na abscissa os valores das concentrações das soluções, respectivamente. A inclinação da reta obtida forneceu o valor da absorvidade molar da ABzA.

6.8.2.4. Determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo rK1-inibidor para a 4-aminobenzamidina (ABzA)

O substrato utilizado foi o Bz-Arg-Nan dissolvido em dimetilsulfóxido produzindo uma solução estoque de concentração 27,60 mM. Com esta solução preparava-se uma solução, 10 vezes diluída no tampão, cuja concentração era de 2,76 mM. A partir desta preparavam-se soluções de uso nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 μ M, respectivamente.

As concentrações molares reais do substrato foram determinadas após hidrólise total com tripsina. (Doação do Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG).

Preparou-se, também, uma solução estoque de ABzA dissolvendo-se 220 mg em 100 mL do tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0. A concentração desta solução era de 10,57 mM. A partir dessa solução foram preparadas, por diluição no tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, soluções de uso nas concentrações: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mM, respectivamente.

As incubações eram realizadas segundo o seguinte protocolo:

Tubo	Tampão (μL)	rK1 (μL)	ABzA (μL)	Pré-incubação 5 min	Substrato (μL)	Incubação 15 min	H Ac (μL)
CS	100	_____	_____		300		50
rK1	50	50	_____		300		50
rK1+ ABzA	_____	50	50		300		50

CS = controle do substrato, HAc = ácido acético a 60% (v/v).

Para cada concentração do substrato, as misturas de incubação rK1 + ABzA continham concentrações crescentes do inibidor ABzA. As misturas eram pré-incubadas durante 5 minutos a 37°C para a homogeneização da temperatura, de acordo com o protocolo acima. Em seguida, adicionava-se o substrato e incubava-se, novamente, durante 15 minutos a 37°C. As reações eram paralisadas pela adição de ácido acético a 60% (v/v).

Foram feitas incubações, em triplicatas, na presença de ABzA nas concentrações: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mM, respectivamente. A seguir, liam-se as absorvâncias em 410 nm, das misturas de incubação, que eram convertidas para velocidade de reação ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) por meio da equação:

$$v = \Delta_{A410} (1/8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}) (1/15 \text{ min}) (1,1/101,7\text{nM})$$

Onde:

$8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ = absorvidade molar da 4-nitroanilina

15 min = tempo de incubação

1,1 = fator de correção para o volume (volume da incubação, dividido pelo volume final da preparação)

101,7 nM = concentração da enzima na incubação

6.8.2.5. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da 4-nitrobenzamidina (NBza)

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de NBZA pesando-se 6,3 mg e dissolvendo-as em 25 mL do tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0. A concentração da solução foi de 1,404 mM. Partindo-se dessa solução foram preparadas, no tampão, em triplicatas, soluções de uso de concentrações 28,08 μM até 56,16 μM , respectivamente.

A solução estoque de NBZA foi submetida à leitura de absorvância entre os comprimentos de onda 200 a 400 nm para a determinação do comprimento de onda em que ocorre a absorção máxima (λ_{max}) que foi em 256 nm. A seguir, leram-se as absorvâncias das soluções de uso neste comprimento de onda. Em seguida, desenhou-se um gráfico locando-se na ordenada os valores de absorvância e na abscissa os valores das concentrações das soluções, respectivamente. A inclinação da reta obtida forneceu o valor da absorvidade molar da NBZA.

6.8.2.6. Determinação da constante de dissociação (K_i) do complexo rK1-inibidor para a 4-nitrobenzamidina (NBzA)

O substrato utilizado foi o Bz-Arg-Nan dissolvido em dimetilsulfóxido produzindo uma solução estoque de concentração 27,60 mM. Com esta solução preparava-se uma solução, 10 vezes diluída no tampão, cuja concentração era de 2,76 mM. A partir desta preparavam-se soluções de uso nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 μ M .

As concentrações molares reais do substrato foram determinadas após hidrólise total com tripsina. (Doação do Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG).

Preparou-se, também, uma solução estoque de NBzA dissolvendo-se 34 mg em 50 mL do tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0. A concentração desta solução era de 4,12 mM. A partir dessa solução foram preparadas, por diluição no tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, soluções de uso nas concentrações: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mM, respectivamente.

As incubações eram realizadas segundo o seguinte protocolo:

Tubo	Tampão (μ L)	rK1 (μ L)	NBzA (μ L)	Pré-incubação 5 min	Substrato (μ L)	Incubação 15 min	H Ac (μ L)
CS	100	_____	_____		300		50
rK1	50	50	_____		300		50
rK1+NBzA	_____	50	50	300	50		

CS = controle do substrato, HAc = ácido acético a 60% (v/v).

Para cada concentração do substrato, as misturas de incubação rK1 + NBzA continham concentrações crescentes do inibidor NBzA. As misturas eram pré-incubadas durante 5 minutos a 37°C para a homogeneização da temperatura, de acordo com o protocolo acima. Em seguida, adicionava-se o substrato e incubava-se, novamente, durante 15 minutos a 37°C. As reações eram paralisadas pela adição de ácido acético a 60% (v/v).

Foram feitas incubações, em triplicatas, na presença de BzA nas concentrações: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mM, respectivamente. A seguir, liam-se as absorvâncias em 410 nm, das misturas de incubação, que eram convertidas para velocidade de reação ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) por meio da equação:

$$v = \Delta_{A410} (1/8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}) (1/15 \text{ min}) (1,1/ 72,5\text{nM})$$

onde:

$8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ = absortividade molar da 4-nitroanilina

15 min = tempo de incubação

1,1 = fator de correção para o volume (volume da incubação, dividido pelo volume final da preparação)

72,5 nM = concentração da enzima na incubação

7. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS PARA AS HIDRÓLISES DO SUBSTRATO BZ-ARG-NAN PELA rK1 NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DOS INIBIDORES

Os cálculos dos parâmetros cinéticos foram realizados pelo Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, da UFMG, utilizando-se o programa Sigma Prot.

Os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} foram calculados baseando-se no modelo clássico de Michaelis-Menten descrito por Cornish Bowden (1981).



A equação da velocidade (v) é:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

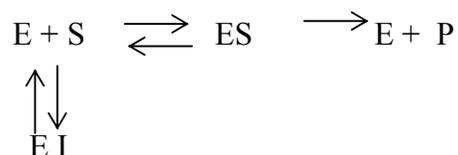
onde: $V_{\max} = k_2 [ES]$

$$\text{e } k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E_0]}$$

8. ESTIMATIVA DO VALOR DA CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO (K_i) PARA O COMPLEXO rK1-BzA

As constantes de dissociação K_i para o complexo, BzA-rK1 foi calculada: 1- a partir do gráfico de $K_m(\text{ap}) \times [I]$; 2- a partir do gráfico de Dixon-Lineweaver-Burk.

Para o cálculo do K_i da BzA utilizou-se o modelo cinético de inibição competitiva descrito por Cornish-Bowden, (1981) o esquema cinético para a inibição é:



A equação da velocidade (v) para esta inibição é:

$$v = \frac{V_{\max} (S)}{K_m \left[1 + \frac{(I)}{K_i} \right] + [S]}$$

Na qual $[I]$ é a concentração do inibidor livre e V_{\max} e K_m têm os seus significados usuais. Como a equação é da forma da equação de Michaelis-Menten ela pode ser escrita:

$$v = \frac{V_m^{\text{ap}} [S]}{K_m^{\text{ap}} + [S]}$$

onde V_m^{ap} e K_m^{ap} são valores aparentes e V_{\max} e K_m são dados por:

$$V_m^{\text{ap}} = V_{\max} ; K_m^{\text{ap}} = K_m \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right]$$

$V_{\max}^{\text{ap}} = V_{\max}$ na presença do inibidor.

Assim, o gráfico de K_m^{ap} versus $[I]$ para um inibidor competitivo, deverá dar uma reta da qual o intercepto sobre o eixo das ordenadas, $K_{m(\text{ap})}$ é o valor de K_m e da inclinação da reta pode-se calcular o valor do K_i para o respectivo inibidor.

9. RESULTADOS

9.1. Síntese da 4-nitrobenzamidina (NBzA)

Seguindo-se a metodologia descrita no item 6.2, obteve-se a 4-nitrobenzamidina com um rendimento de 66%.

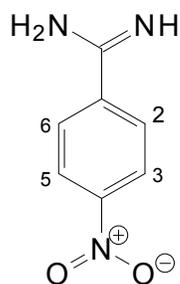
9.2. Caracterização da 4-nitrobenzamidina

A 4-nitrobenzamidina foi caracterizada por análises espectrométricas do RMN ^1H e no IV, análise elementar e a faixa de fusão.

9.2.1. Espectro de absorção da NBzA no infravermelho

O espectro de absorção no Infravermelho (Espectro 1), mostrado à pag. 68, apresentou as bandas correspondentes: ν_{max} , cm^{-1} , KBr: 3400, 3250 e 3080 (N-H), 1660, 1580 e 1500 (C=N) (C=C), 1500 e 1320 (N=O), 850 (1,4-di-substituídos).

9.2.2. Espectro de ressonância magnética nuclear da NBzA



O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, (Espectro 2) da 4-nitrobenzamidina, mostrado à pag. 69 e 70, apresenta os seguintes sinais: RMN de ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 8,25 (duplete, 2H, H-3, e H-5, J₃₋₂ = J₅₋₆ = 8,5Hz), 8,03 (duplete, 2H, H-2 e H-6, J₂₋₃ = J₆₋₅ = 8,5Hz), 6,65 (singleto, 3H, grupo amidina).

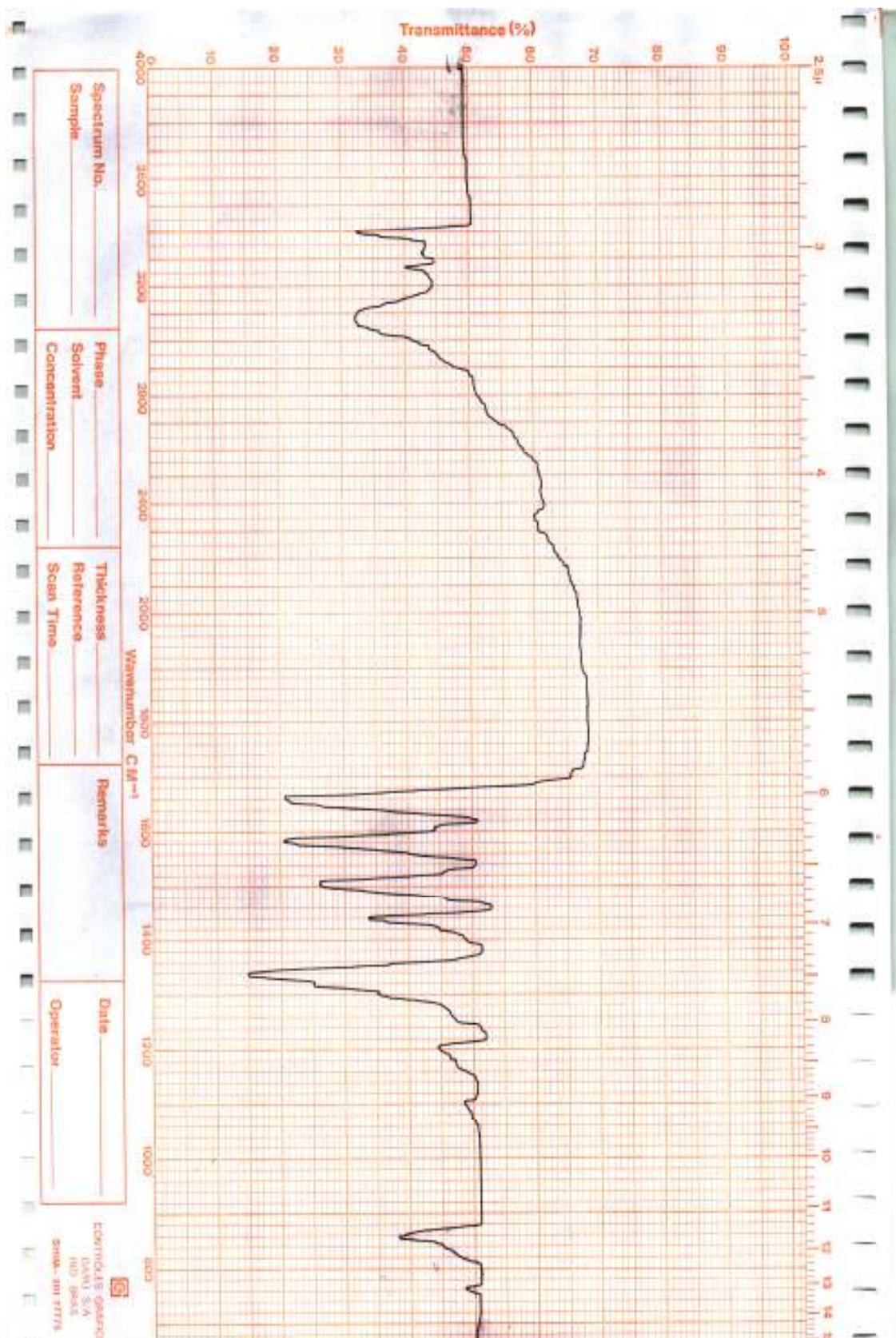
9.2.3. Análise elementar da NBzA

Os valores calculados foram: C=50,91%, H=4,27% e N=25,44%.
Valores encontrados foram: C=50,57%, H=3,95% e N=25,20%.

9.2.4. Faixa de fusão

A faixa de fusão observada 290-293,1°C comprova a pureza da substância, como descrito por Saari *et al.*, 1978.

Espectro 1- Espectro no IV da 4-nitrobenzamidina:



Espectro 2- Espectro de RMN da 4-nitrobenzamidina

Espectro 2- Espectro de RMN (aumentado 100X)

9.3. Purificação da calicreína tecidual do rato (rK1)

A purificação da rK1 foi realizada em três etapas. A primeira etapa foi a preparação do extrato bruto, a segunda etapa a cromatografia de troca iônica do extrato bruto em coluna DEAE-Sepharose e a terceira etapa a cromatografia de afinidade da rK1, parcialmente purificada, em coluna de Sepharose-aprotinina. Os resultados da purificação da rK1 estão apresentados na tabela I.

Partindo-se de 44,91 mg de proteínas no extrato bruto, preparado a partir de dois gramas do pó de glândulas submandibulares de ratos, foram obtidas duas preparações de rK1, rK1 (1) e rK1 (2) uma com 0,84 mg e a outra com 0,44 mg de proteína, respectivamente. As duas preparações rK1 (1) e rK1 (2) foram purificadas 16 vezes e 5 vezes, com rendimentos de 30 e 11%, respectivamente.

Tabela I – Purificação da rK1

Etapa	Proteína Total (mg)	Atividade amidásica específica ($\mu\text{M. min}^{-1}. \text{mg}^{-1}$)	Atividade amidásica total ($\mu\text{M. min}^{-1}$)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	44,91	207,50	9318,83	1,0	100
DEAE-	I- 1,80	2400,24	4320,00	11,56	46
Sepharose	II-1,59	1176,53	1838,88	5,67	20
Sepharose-	rK1(1) 0,84	3326,47	2794,23	16,03	30
Aprotinina	rK1(2) 0,44	1029,42	452,94	4,96	11

I- Eluato contendo a rK1 (1).

II- Eluato contendo rK1 (2).

Como mostrado na tabela I, a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose removeu uma grande quantidade de proteína inativa contaminante.

As atividades amidásicas específicas dos eluatos I e II da coluna de DEAE-Sepharose aumentaram 11,6 e 5,7 vezes respectivamente. Nessa etapa observaram-se rendimentos de 46 e 20 % para os eluatos I e II, respectivamente.

A atividade amidásica específica da rK1 (1) eluída da coluna de Sepharose-aprotinina aumentou 1,4 vezes enquanto que a da rK1 (2) permaneceu aproximadamente igual à do eluato II da coluna de DEAE-Sepharose.

O rendimento final das preparações de rK1(1) e rK1(2) foi de 30% e 11%, respectivamente.

9.3.1. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B

A cromatografia de troca iônica do extrato bruto em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B, equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, é apresentada na Figura 1.

Como pode-se observar um grande pico de proteína passou pela coluna sem fixar-se à resina, sendo eluído com o tampão de equilíbrio. Ao aplicar-se à coluna o tampão de equilíbrio adicionado de NaCl 0,125M (seta) foram eluídos dois picos de proteínas, o primeiro sem atividade amidásica e o segundo com alta atividade amidásica. Ao aplicar-se à coluna o tampão de equilíbrio adicionado de NaCl 0,250 M (seta) eluiu-se um outro pico de proteína com alta atividade amidásica. A seguir, aplicou-se o tampão de equilíbrio adicionado de NaCl 0,500 M (seta) eluindo-se um pico de proteínas totalmente sem atividade amidásica.

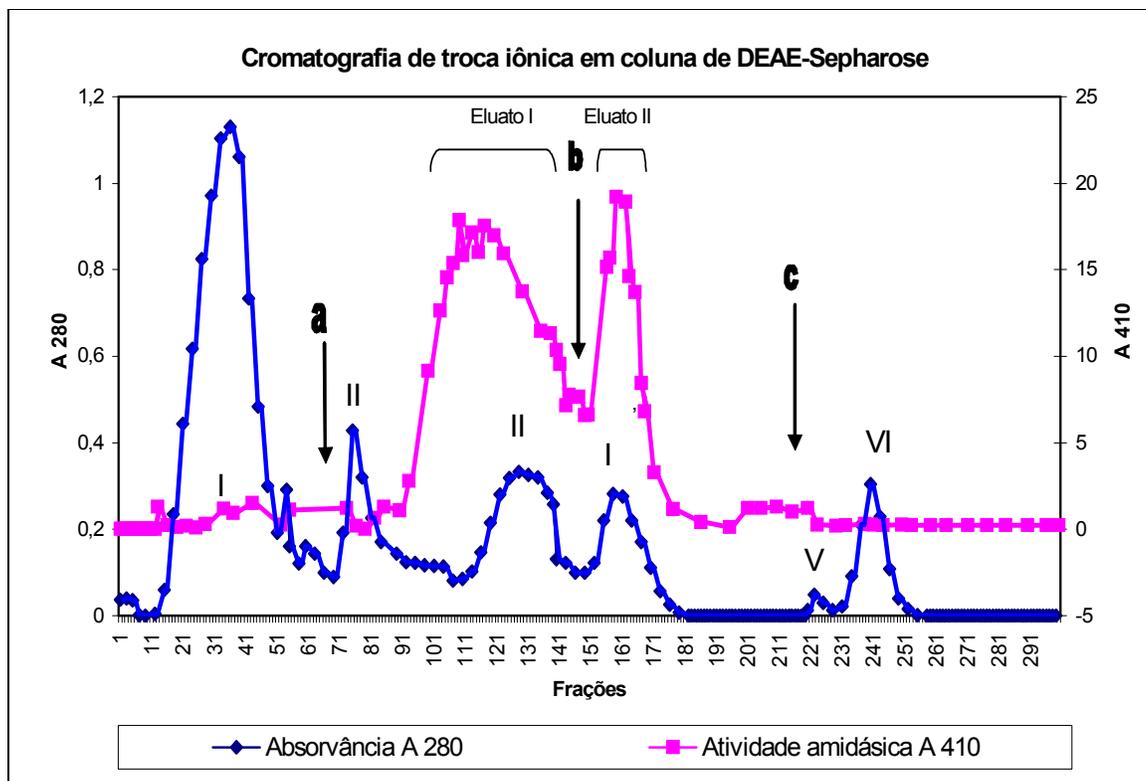


Figura 1 : Cromatografia de troca iônica do extrato bruto em coluna de DEAE-Sepharose

Condições: Coluna (8,0 x 2,8 cm) com DEAE-Sepharose equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0.

Amostra: 53,0 mL do extrato bruto (44,91 mg de proteínas).

Eluição: Até a fração 70 a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio. Da fração 71 até a fração 149 a coluna foi desenvolvida com o tampão de equilíbrio adicionado de NaCl 0,125 M (seta a).

a-)Da fração 150 até a fração 210 a coluna foi desenvolvida com o tampão de equilíbrio adicionado de NaCl 0,25 M (seta b).

b-)Da fração 211 até a fração 300 a coluna foi desenvolvida com o tampão equilíbrio adicionado de NaCl 0,50 M (seta c).

c-) A coluna foi desenvolvida com o fluxo de 36 mL/h sob refrigeração de 4 °C. A atividade amidásica foi determinada com o substrato Bz-Arg-Nan segundo o método de Erlanger *et al.* (1961) como descrito por Sousa (1993).

9.3.2. Cromatografia de afinidade, do eluato I da coluna de DEAE-Sepharose, em coluna de Sepharose-aprotinina

A Figura 2 mostra o perfil cromatográfico obtido da cromatografia do eluato I, proveniente da cromatografia em DEAE-Sepharose, na coluna de Sepharose-aprotinina. Podem-se observar que seis picos de proteínas (I-VI), Os picos I e II desprovidos de atividade amidásica passaram pela coluna sem fixar-se à aprotinina e foram eluídos com o tampão de equilíbrio. A aplicação à coluna do tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 3,5, NaCl 1 M (seta), eluíram-se quatro picos de proteínas (III, IV, V e VI), dois picos com alta atividade amidásica (III, IV) seguidos de dois picos desprovidos de atividade amidásica (V e VI). As frações 61 a 80 foram ajuntadas e a solução resultante, com 38 mL, foi denominada rK1 (1). Essa amostra foi concentrada por ultrafiltração para 13,0 mL.

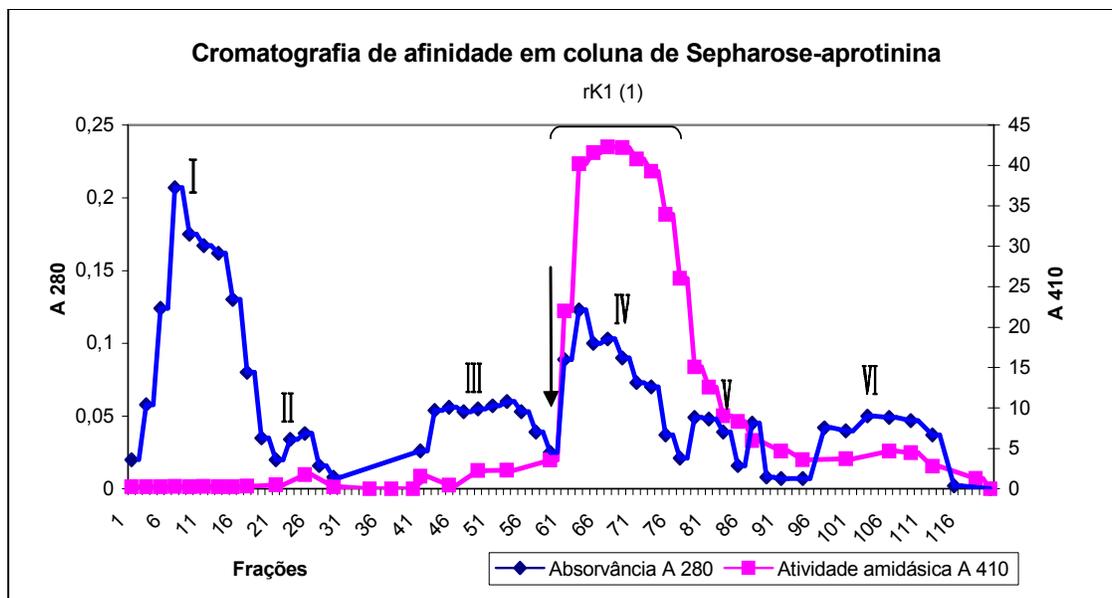


Figura 2: Cromatografia de afinidade do eluato I, da coluna de DEAE-Sepharose em coluna de Sepharose-aprotinina

Condições: Coluna (6,5 x 2,8 cm) com Sepharose-aprotinina equilibrada em tampão glicina-NaOH 0,1M, pH 9,0, NaCl 0,75 M, contendo azida de sódio 0,05% (p/v).

Amostra: Eluato I, de 28 ml (1,804 mg de proteínas) proveniente da cromatografia em DEAE-Sepharose.

Eluição: Até a fração 60 a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio. A partir da fração 61 (seta) a coluna foi eluída com o tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 3,5, NaCl 1M. Fluxo de 45 mL/h. Frações de 2,5 mL coletadas em tubos contendo 0,5 mL de tampão Tris-HCl 2,0 M, pH 8,5. A cromatografia foi desenvolvida sob refrigeração de 4°C. A atividade amidásica com o substrato Bz-Arg-Nan foi determinada segundo o método de Erlanger *et al.* (1961), como descrito por Sousa (1993).

9.3.3. Cromatografia de afinidade, do eluato II da coluna de DEAE-Sepharose, em coluna de afinidade em Sepharose-aprotinina

A Figura 3 mostra o perfil cromatográfico obtido da cromatografia do eluato II, proveniente da cromatografia em DEAE-Sepharose, na coluna de Sepharose-aprotinina. Pode-se observar que um grande pico de proteínas, desprovido de atividade amidásica passou pela coluna sem fixar-se à aprotinina e foi eluído com o tampão de equilíbrio. A aplicação à coluna do tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 3,5, NaCl 1 M (seta), eluiu dois picos de proteína (I e II), sendo o primeiro apresentando atividade amidásica e o segundo desprovido de atividade amidásica. As frações 76 a 100 foram ajuntadas e a solução resultante com 48 mL foi denominada rK1 (2). Essa amostra foi concentrada por ultrafiltração para 9,5 mL.

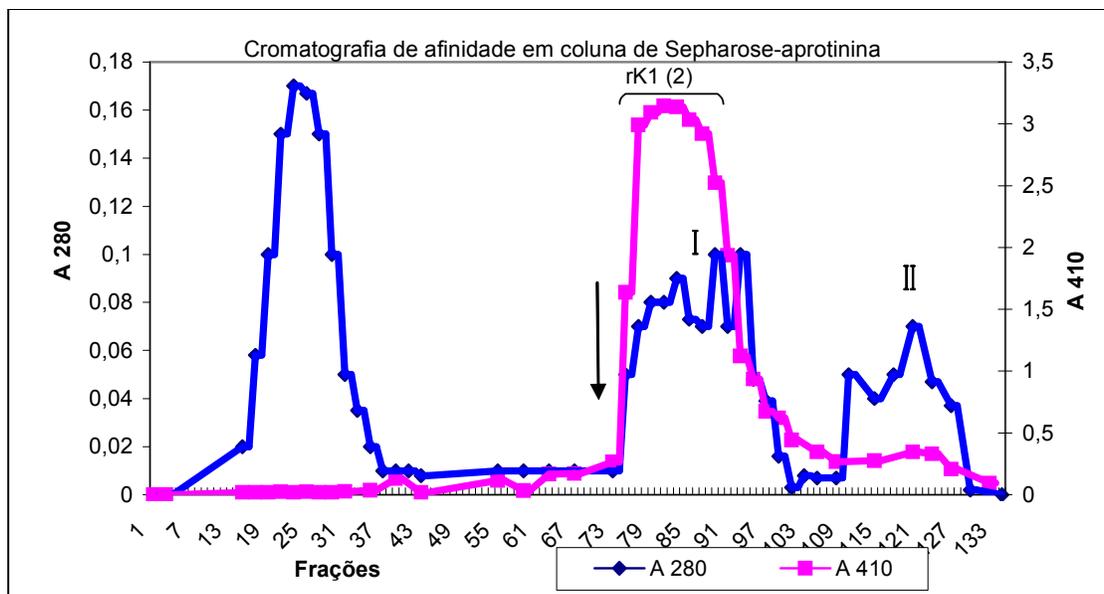


Figura 3: Cromatografia de afinidade do eluato II, da coluna de DEAE-Sepharose em coluna de Sepharose-aprotinina

Condições: Coluna (6,5 x 2,8 cm) com Sepharose-aprotinina equilibrada em tampão glicina-NaOH 0,1M, NaCl 0,75M, pH 9,0.

Amostra: Eluato II (23 ml correspondendo a 1,59 mg de proteínas) proveniente da cromatografia em DEAE-Sepharose.

Eluição: Até a fração 74 a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio. A partir da fração 75 a coluna foi eluída com o tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 3,5, NaCl 1 M,. Fluxo de 45 mL/h. Frações de 2,5 mL coletadas em tubos contendo 0,5 mL de tampão Tris-HCl 2,0 M, pH 8,5. A cromatografia foi desenvolvida sob refrigeração de 4°C. A atividade amidásica foi determinada com o substrato Bz-Arg-Nan segundo o método de Erlanger *et al.* (1961), como descrito por Sousa (1993).

9.4. Critério de pureza e determinação do peso molecular aparente da rK1 por cromatografia de filtração molecular

9.4.1. Cromatografia da solução de rK1 em coluna de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC.

A Figura 4 (painéis A e B) mostra os perfis cromatográficos das amostras rK1 (1) e rK1 (2), respectivamente, obtidos das cromatografias dos eluatos I e II, provenientes das cromatografias de Sepharose-aprotinina, na coluna de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC. Pode-se observar, na Figura, que as duas preparações apresentaram picos protéicos únicos com atividades amidásicas completamente superpostas. Tais perfis demonstram a pureza das amostras de rK1 (1) e rK1(2), respectivamente.

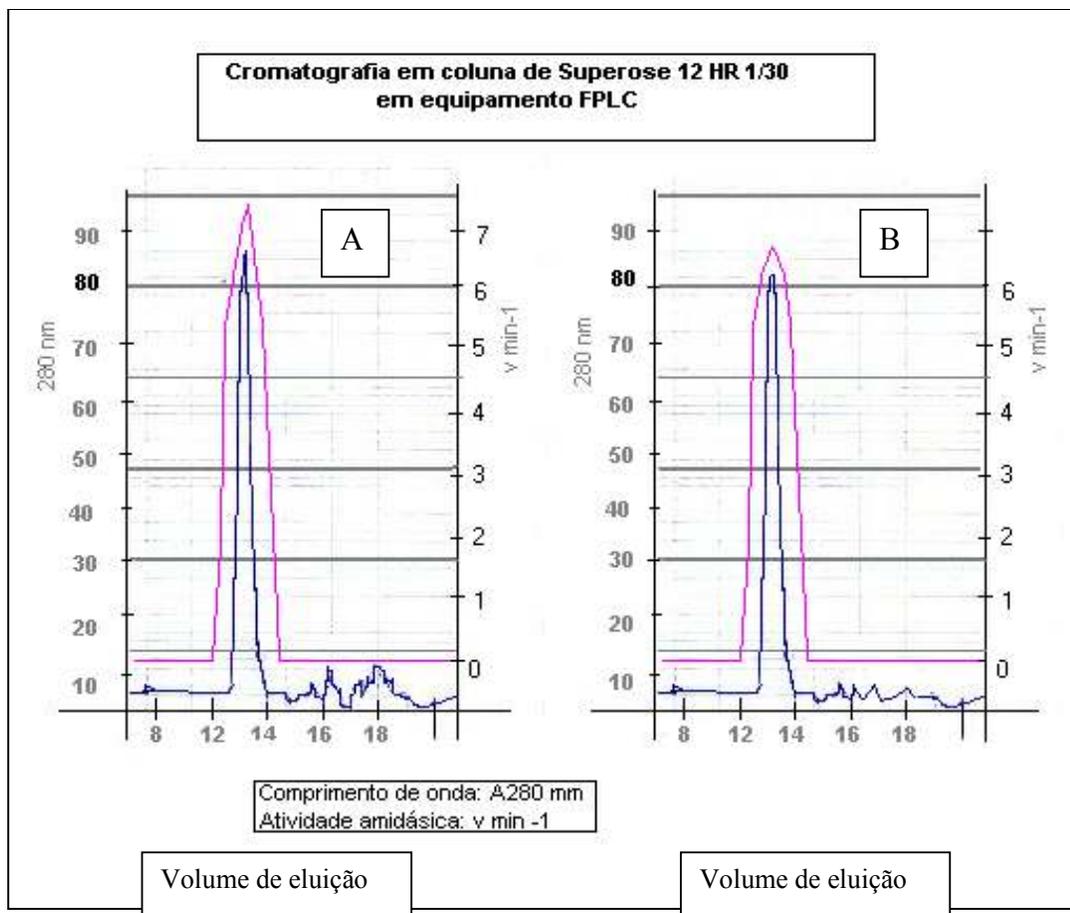


Figura 4: Cromatografias da soluções de rK1 (1) e rK1 (2) em coluna de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC

Condições: Coluna (10x 300 mm) cheia com gel de Superose 12 HR equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, contendo NaCl 0,1 M,.

Amostras aplicadas: 50 μ g da rK1(1) em 200 μ L, (amostra A) e 50 μ g da rK1(2) em 200 μ L, (amostra B). Fluxo de 0,5 mL/ min. Pressão de 2,0 Mpa. Volume das frações de 500 μ L. A atividade amidásica foi determinada com o substrato Bz-Arg-Nan segundo o método de Erlanger *et al.* (1961), como descrito por Sousa (1993).

9.4.2. Determinações dos pesos moleculares aparentes das amostras rK1 (1) e rK1 (2) eluídos da coluna de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC

A Figura 5 mostra a curva padrão utilizada para a estimativa dos pesos moleculares aparentes das amostras de rK1 (1) e rK1 (2). Os valores de K_{av} para os padrões foram determinados por cromatografia em gel de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC.

A cromatografia do padrão de dextrana azul permitiu o cálculo do volume de exclusão da coluna (V_o). O volume total (V_t) foi determinado a partir do diâmetro interno da coluna e da altura do leito de gel. Os volumes de eluição (V_e) dos padrões e das amostras de rK1 (1) e rK1 (2) foram determinados a partir dos seus tempos de retenção na mesma coluna. Com os dados de V_o , V_t e V_e para cada padrão foram calculados os respectivos K_{av} (constante do tempo de retenção).

O gráfico mostra a curva padrão obtida locando-se na ordenada os valores dos logaritmos dos pesos moleculares dos padrões e na abscissa os respectivos valores dos K_{av} 's. Os padrões utilizados na construção da curva foram: β -amilase ($K_{av} = 0,160$), álcool desidrogenase ($K_{av} = 0,191$), BSA ($K_{av} = 0,238$), ovoalbumina ($K_{av} = 0,277$), tripsinogênio ($K_{av} = 0,389$), citocromo ($K_{av} = 0,477$) e aprotinina ($K_{av} = 0,653$).

Os valores de V_e para as amostras de rK1 (1) e rK1 (2) permitiram calcular o valor de $K_{av} = 0,314$. A seta indica a interpolação gráfica do valor de K_{av} que corresponde ao peso molecular aparente de 36200 para as amostras de rK1 (1) e rK1 (2), respectivamente.

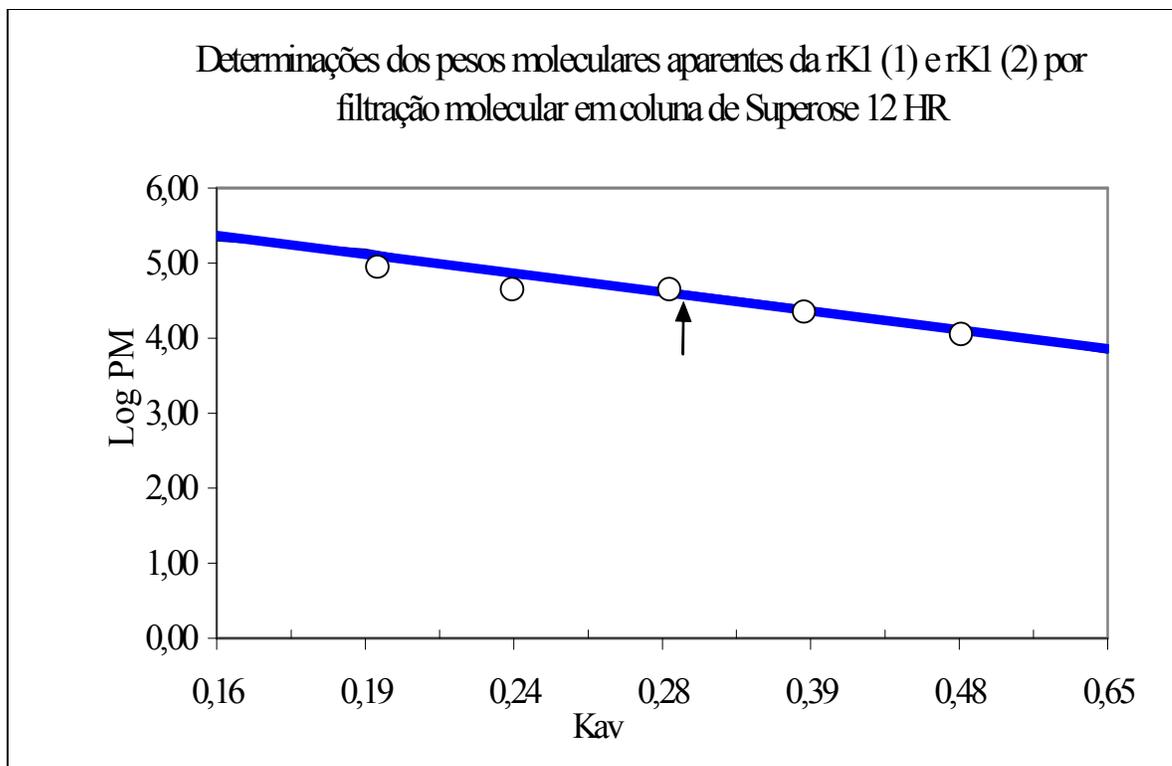


Figura 5: Determinações dos pesos moleculares aparentes da rK1 (1) e da rK1 (2) em coluna de Superose 12 HR 1/30 em equipamento FPLC

Condições experimentais descritos em Métodos.

Os padrões utilizados na construção da curva foram: β -amilase ($K_{av} = 0,160$), álcool desidrogenase ($K_{av} = 0,191$), BSA ($K_{av} = 0,238$), ovoalbumina ($K_{av} = 0,277$), tripsinogênio ($K_{av} = 0,389$), citocromo ($K_{av} = 0,477$) e aprotinina ($K_{av} = 0,653$).

Os pesos moleculares aparentes foram determinados por interpolação gráfica dos valores de K_{av} que foram iguais a 0,314. Esse valor corresponde ao PM de 36200.

9.5. Caracterização cinética da rK1

9.5.1. Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da aprotinina

A Figura 6 mostra a reta utilizada para a determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da aprotinina cujo valor encontrado foi 8299 ± 93 .

9.5.2. Titulação do centro ativo da amostra de rK1 (1) com a aprotinina

A Figura 7 mostra uma reta obtida locando-se na ordenada os valores das velocidades de reação ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) e na abscissa os valores das concentrações de aprotinina nas misturas de incubação. O valor encontrado da concentração da aprotinina que inibe completamente a rK1 (1) na reação foi de 17,21 nM. Admitindo-se que a rK1 (1) e a aprotinina reagem eqüimolarmente a concentração molar da solução de rK1 (1) utilizada no ensaio (100 μL) era de 17,21 nM, correspondendo a 172,1 nM por mL. Como esta solução é proveniente da diluição da solução de rK1 (1) 100 vezes com o tampão-glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, contendo azida de sódio a 0,05% (p/v), multiplicada pelo peso molecular de 36200, gerando a concentração da solução original da rK1 (1) de 62,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

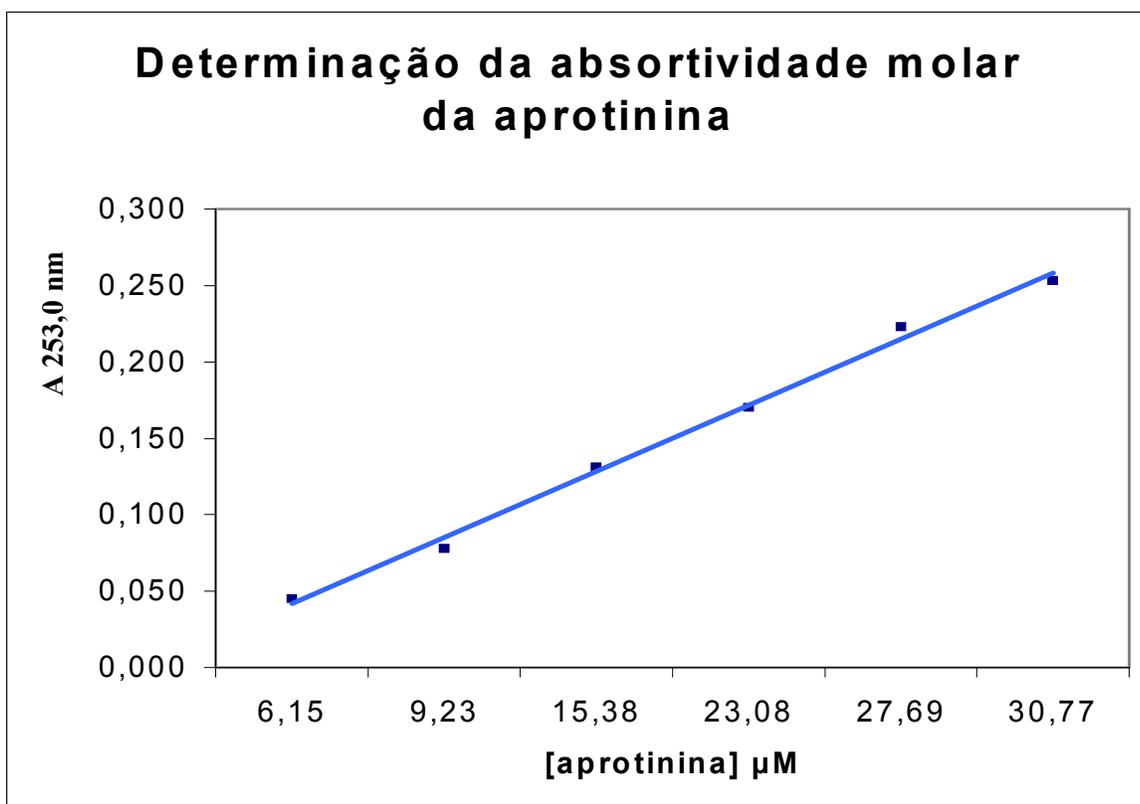


Figura 6: Determinação da absorvidade molar (ϵ_M) da aprotinina.

Condições experimentais descritas em Métodos. A partir dos valores da inclinação da reta foi determinado a absorvidade molar da aprotinina em 253 nm: $\epsilon_M = 8299,93 \pm 93$.

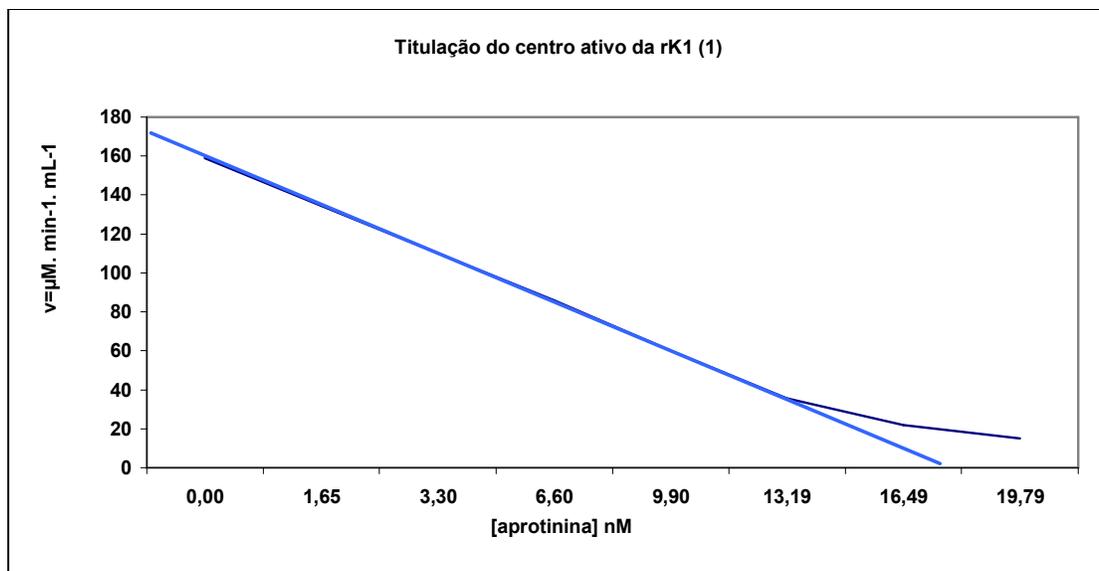


Figura 7: Titulação do centro ativo da rK1 (1)

Condições experimentais descritas em Métodos. Na ordenada encontram-se os valores das velocidades das reações e na abscissa os valores das concentrações das soluções de uso da aprotinina. A extrapolação da reta até a abscissa indica a concentração equimolar da rK1 (1). Os dados foram analisados estatisticamente por correlação e regressa linear.

O valor da correlação: -0,96

Regressão linear: ($y = -1,450x + 24,95$).

O valor de aprotinina foi de 17,21 nM, em equimolaridade determinou-se a rK1 (1) de 62,33 μg/mL.

9.5.3. Titulação do centro ativo da amostra de rK1 (2) com a aprotinina

A Figura 8 mostra uma reta locando-se na ordenada os valores das velocidades de reação ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) e na abscissa os valores das concentrações de aprotinina nas misturas de incubação. O valor encontrado da concentração da aprotinina que inibe completamente a rK1 (2) na reação foi de 11,78 nM. Admitindo-se que a rK1 (2) e a aprotinina reagem eqüimolarmente a concentração molar da solução de rK1 (2) utilizada no ensaio (100 μL) era de 11,78 nM, correspondendo a 117,79 nM por mL. Como esta solução é proveniente da diluição da solução de rK1 (2) 100 vezes com o tampão-glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, contendo azida de sódio a 0,05% (p/v), multiplicada pelo peso molecular de 36200, gerando a concentração da solução original da rK1 (2) de 42,63 $\mu\text{g/mL}$.

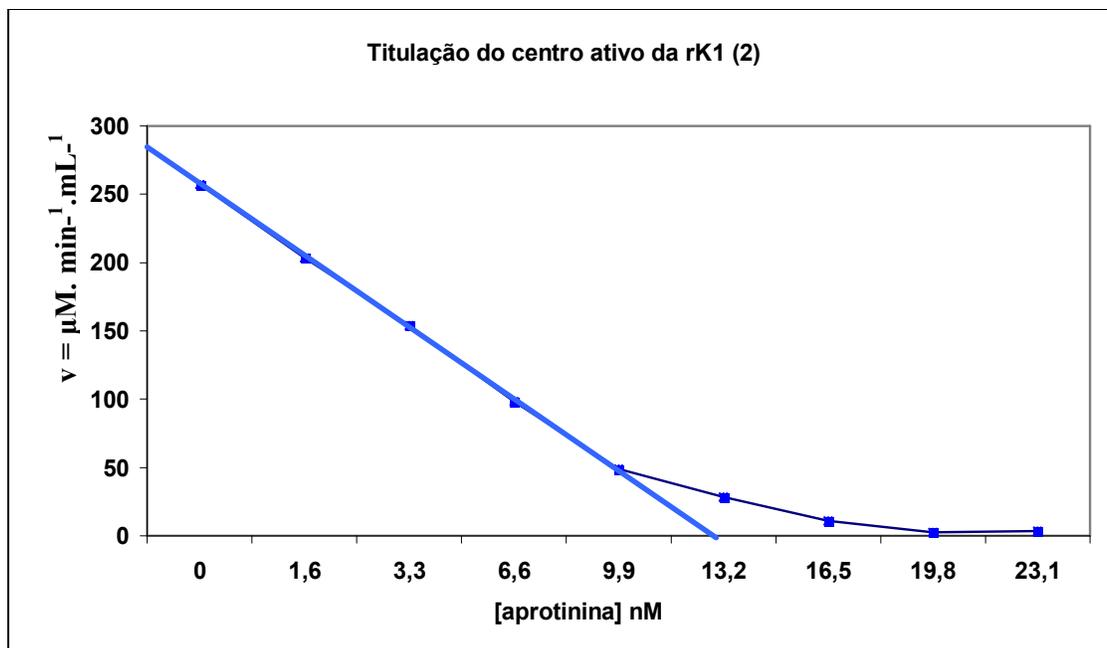


Figura 8: Titulação do centro ativo da rK1 (2)

Condições experimentais descritas em Métodos. Na ordenada encontram-se os valores das velocidades das reações e na abscissa os valores das concentrações das soluções de uso da aprotinina. A extrapolação da reta até a abscissa indica a concentração equimolar da rK1 (2). Os dados foram analisados estatisticamente por correlação e regressa linear.

O valor da correlação: -0,96

Regressão linear: $(y = -33,56x + 395,30)$.

O valor de aprotinina foi de 11,78 nM, em equimolaridade determinou-se a concentração de rK1 (2) de 42,63 μg/mL.

9.5.4. Absortividade molar (ϵ_M) da benzamidina

A Figura 9 mostra a reta utilizada para a determinação da absortividade molar (ϵ_M) da benzamidina.

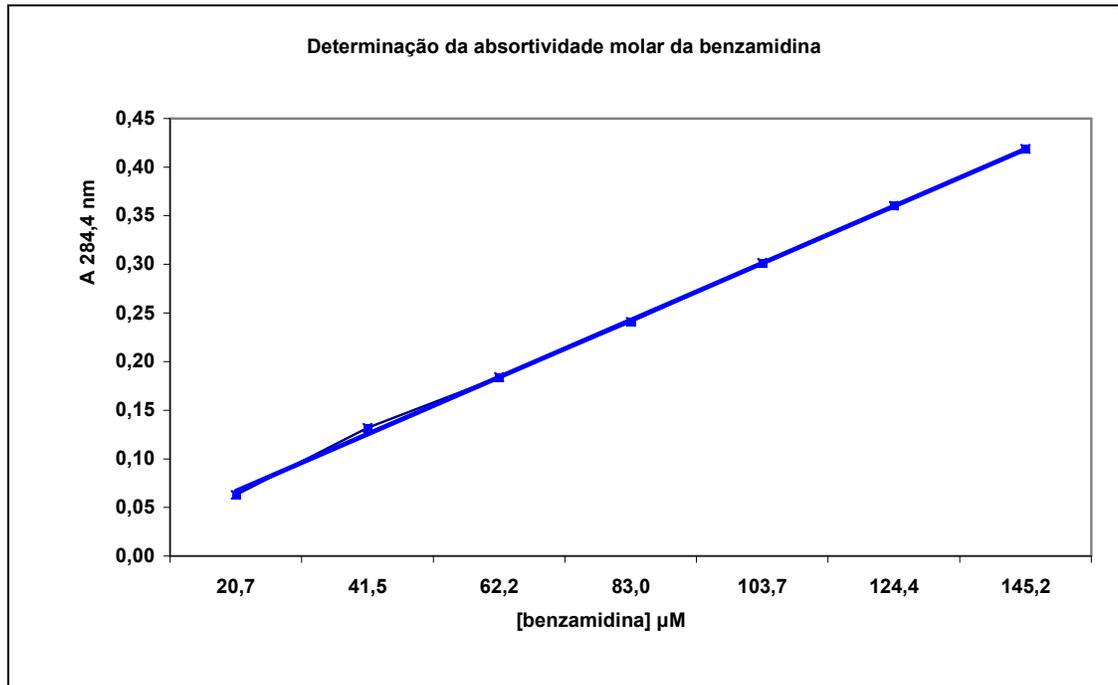


Figura 9: Absortividade molar (ϵ_M) da benzamidina

Condições experimentais descritas em Métodos. A partir da inclinação da reta foi determinada a absortividade molar da BzA em 284 nm: $\epsilon_M = 2930 \pm 58$.

9.5.5 Absortividade molar (ϵ_M) da 4-aminobenzamida

A Figura 10 mostra a reta utilizada para a determinação da absortividade molar (ϵ_M) da 4-aminobenzamida.

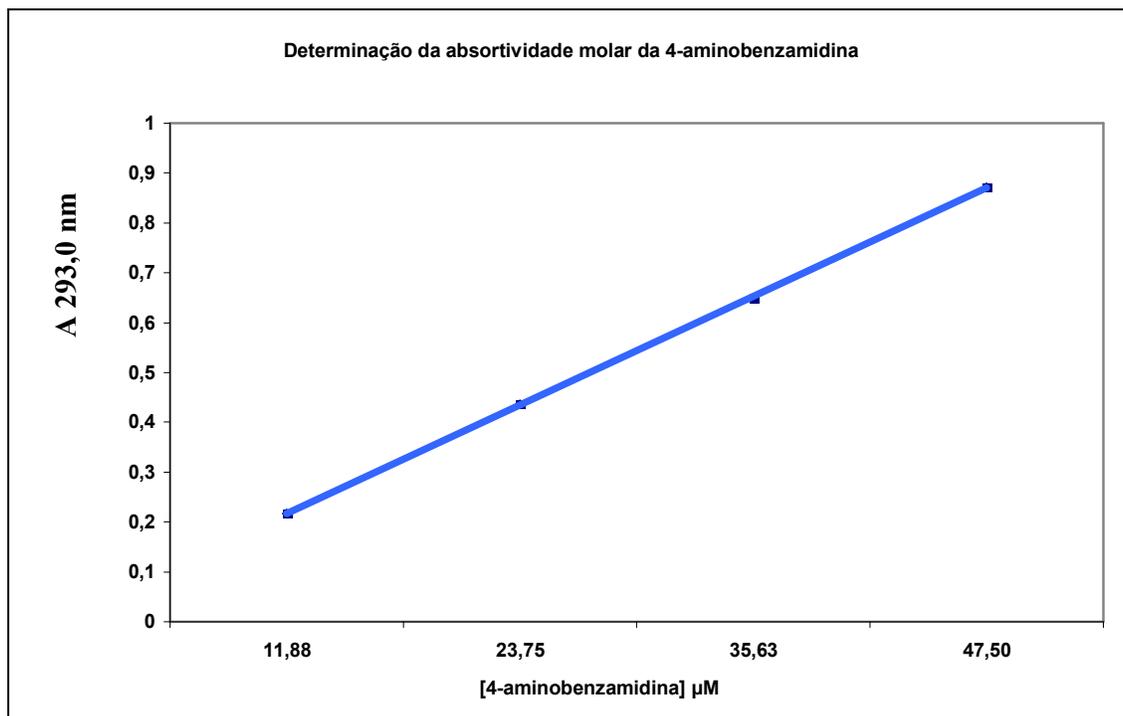


Figura 10: Absortividade molar (ϵ_M) da 4-aminobenzamida

Condições experimentais descritas em Métodos. A partir da inclinação da reta foi determinada a absortividade molar da ABzA em 293 nm: $\epsilon_M = 18287 \pm 89$.

9.5.6. Absortividade molar (ϵ_M) da 4-nitrobenzamidina

A Figura 11 mostra a reta utilizada para a determinação da absortividade molar (ϵ_M) da 4-nitrobenzamidina.

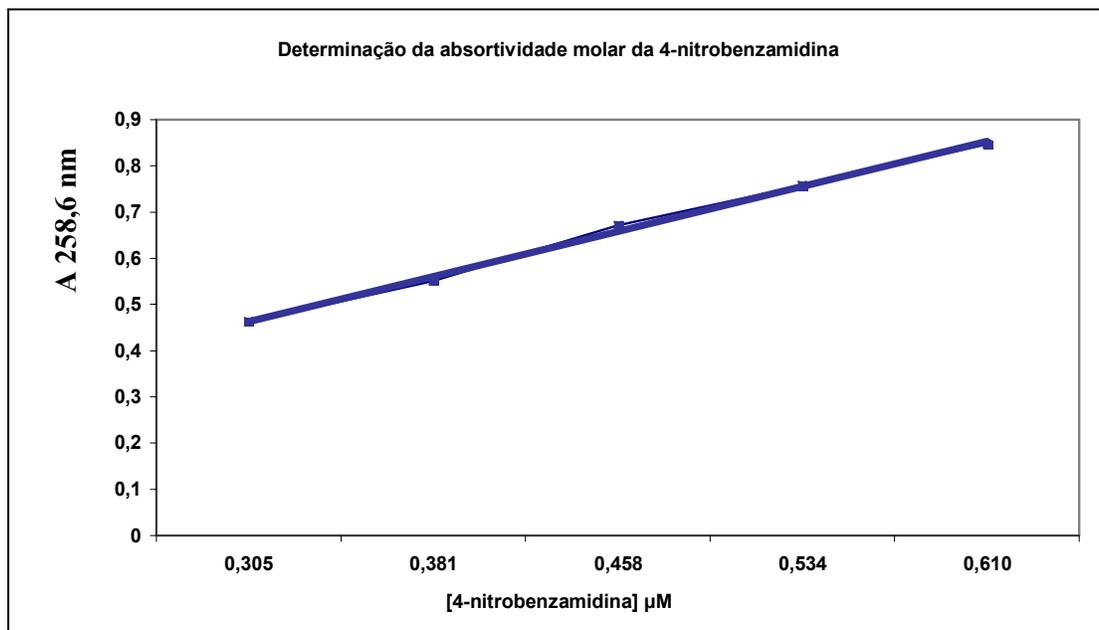


Figura 11: Absortividade molar (ϵ_M) da 4-nitrobenzamidina

Condições experimentais descritas em Métodos. A partir da inclinação da reta foi determinada a absortividade molar da NBZA em 258 nm: $\epsilon_M = 14036 \pm 84$.

9.6. Inibição da atividade amidásica da rK1 pelos inibidores BzA, ABzA e NBzA

A Tabela II apresenta os valores de atividade amidásica calculados para os dados de inibição da rK1 pelos inibidores BzA, ABzA e NBzA. Foram utilizados 11,3 nM de rK1 para os inibidores benzamidina e 4-aminobenzamidina e 8,0 nM de rK1 para o inibidor 4-nitrobenzamidina.

As Figuras 12, 18 e 21 mostram os gráficos de Michaelis-Menten para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan, catalizada pela rK1, na ausência e na presença de BzA, ABzA e NBzA, respectivamente.

As Figuras 13, 19 e 22 mostram os gráficos de Lineweaver-Burk para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan, catalizada pela rK1, na ausência e na presença de BzA, ABzA e NBzA, respectivamente.

As Figuras 14, 20 e 23 mostram os gráficos de Hanes para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan, catalizada pela rK1, na ausência e na presença de BzA, ABzA e NBzA, respectivamente.

A Figura 15 mostra o gráfico de Dixon-Hanes para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan, catalizada pela rK1, na ausência e na presença de BzA.

A Figura 16 mostra o gráfico do $K_{m(ap)}$ versus a concentração da BzA para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan, catalizada pela rK1, na ausência e na presença de BzA.

A Figura 17 mostra o gráfico de Dixon-Lineweaver-Burk para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan, catalizada pela rK1, na ausência e na presença de BzA.

Tabela II- Valores de atividade amidásica encontrados na cinética dos inibidores BzA, ABzA e NBzA.

		benzamidina mM						} Velocidades das reações (min ⁻¹)
Bz-Arg-Nan	0	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40		
25(μM)	19,38	18,24	17,09	15,70	14,72	13,82		
50(μM)	33,70	31,08	28,95	26,50	24,45	23,14		
75(μM)	43,51	41,47	38,20	34,19	31,58	27,89		
100(μM)	51,53	48,50	44,00	41,39	38,28	35,41		
125(μM)	54,88	52,59	49,89	46,95	43,84	41,22		
150(μM)	57,34	55,37	52,43	49,97	47,52	44,25		
175(μM)	60,53	58,24	56,03	53,49	49,89	46,87		
200(μM)	63,80	61,26	58,24	55,37	52,02	48,91		

		4-aminobenzamidina mM						} Velocidades das reações (min ⁻¹)
Bz-Arg-Nan	0	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40		
25(μM)	17,99	15,76	13,00	10,06	8,04	5,80		
50(μM)	32,06	27,07	24,21	19,63	16,93	14,47		
75(μM)	38,28	33,45	28,95	25,43	22,65	18,81		
100(μM)	46,78	41,39	38,44	32,14	27,15	22,57		
125(μM)	50,96	45,97	40,90	35,01	30,18	24,86		
150(μM)	53,59	50,63	44,66	38,60	31,65	25,76		
175(μM)	56,85	50,30	46,78	39,59	35,25	30,67		
200(μM)	59,87	54,96	50,06	45,15	40,00	33,86		

		4-nitrobenzamidina mM						} Velocidades das reações (min ⁻¹)
Bz-Arg-Nan	0	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40		
25(μM)	16,19	13,49	12,10	11,32	9,65	7,52		
50(μM)	22,24	18,89	17,25	15,54	14,56	12,67		
75(μM)	25,19	22,90	20,85	18,40	16,44	14,74		
100(μM)	28,63	26,17	23,06	20,36	18,48	15,91		
125(μM)	31,98	26,83	24,76	22,16	21,59	18,07		
150(μM)	31,82	30,10	25,93	22,65	21,02	19,38		
175(μM)	33,29	30,42	27,73	24,94	21,75	19,30		
200(μM)	38,46	33,86	31,41	28,05	24,94	21,10		

Condições: Vide métodos.

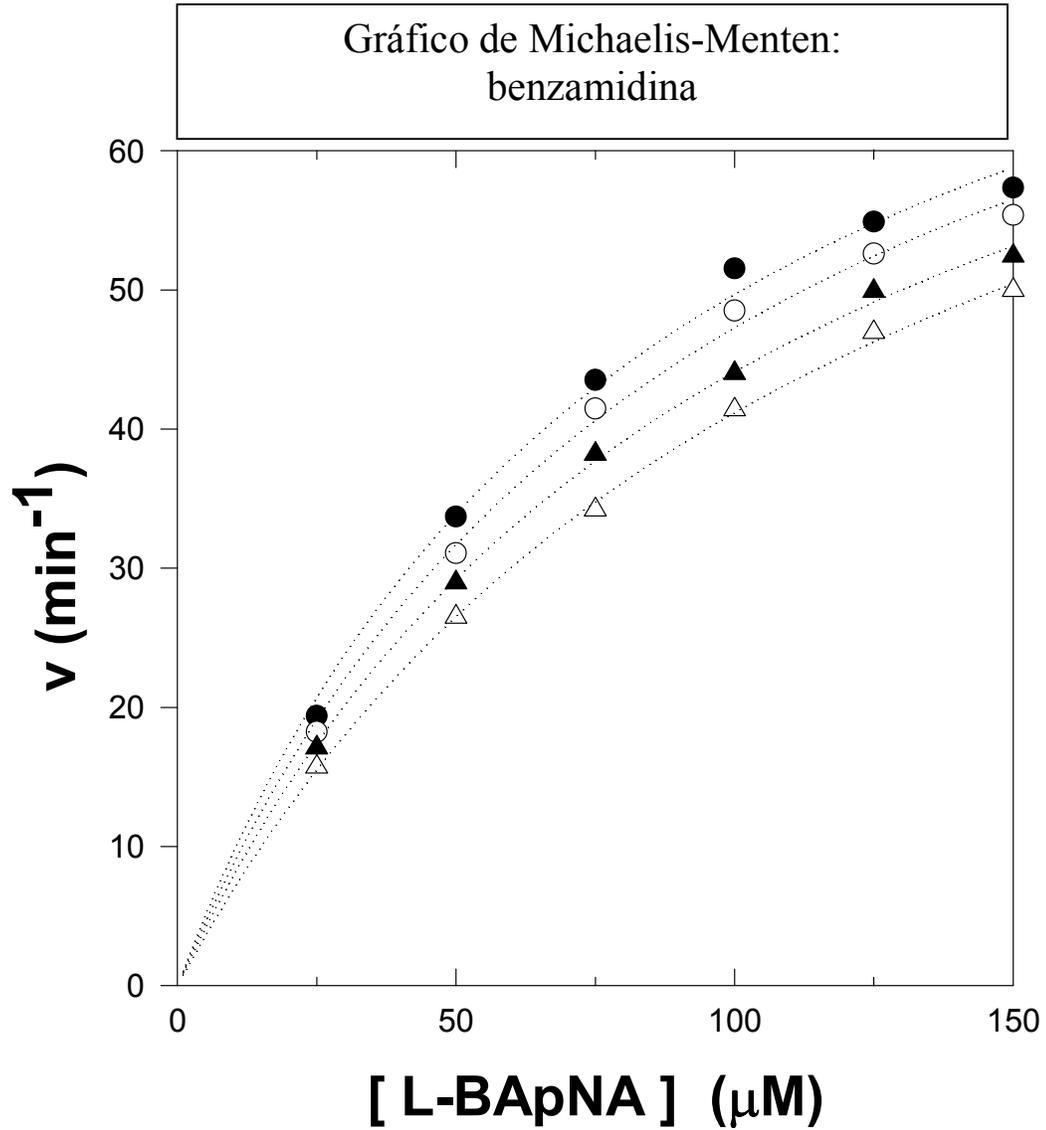


Figura 12- Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina: (●) BzA = 0 mM; (○) BzA = 0,05 mM; (▲) BzA = 0,10 mM; (Δ) BzA = 0,20 mM.

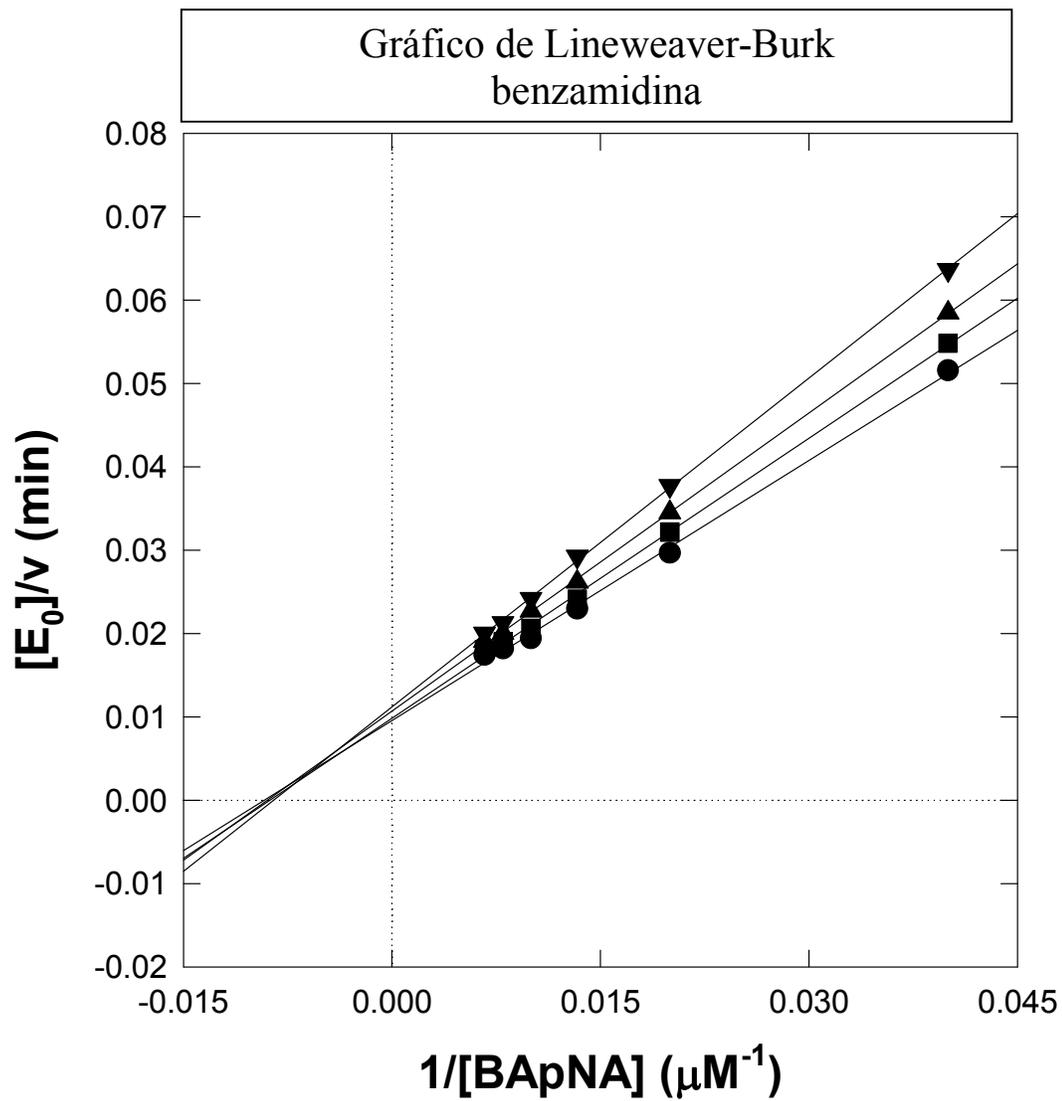


Figura 13- Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina: (●) BzA = 0 mM; (■) BzA = 0,05; (▲) BzA = 0,10 mM; (▼) BzA = 0,20 mM.

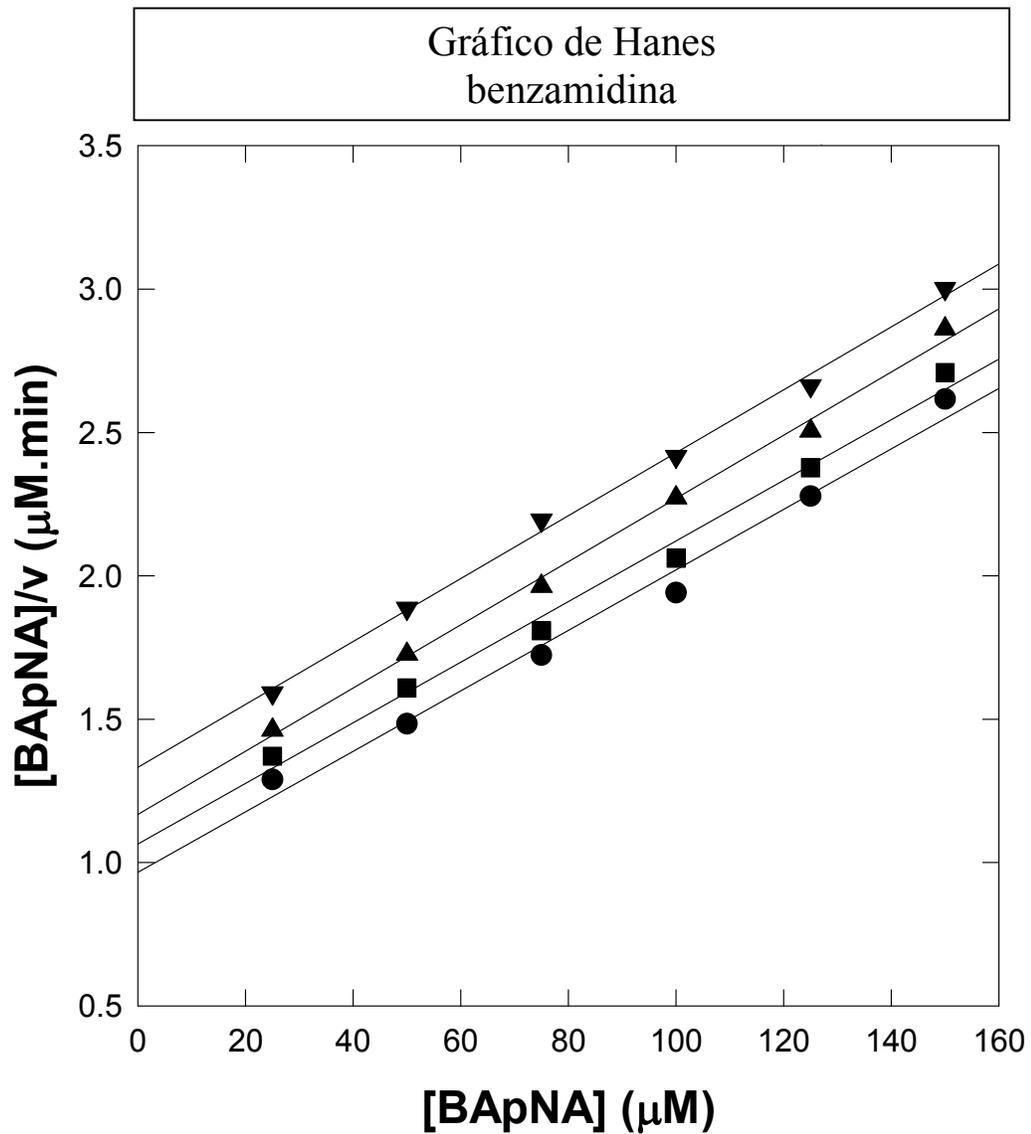


Figura 14- Gráfico de Hanes para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina: (●) BzA = 0 mM; (■) BzA = 0,05; (▲) BzA = 0,10 mM; (▼) BzA = 0,20 mM.

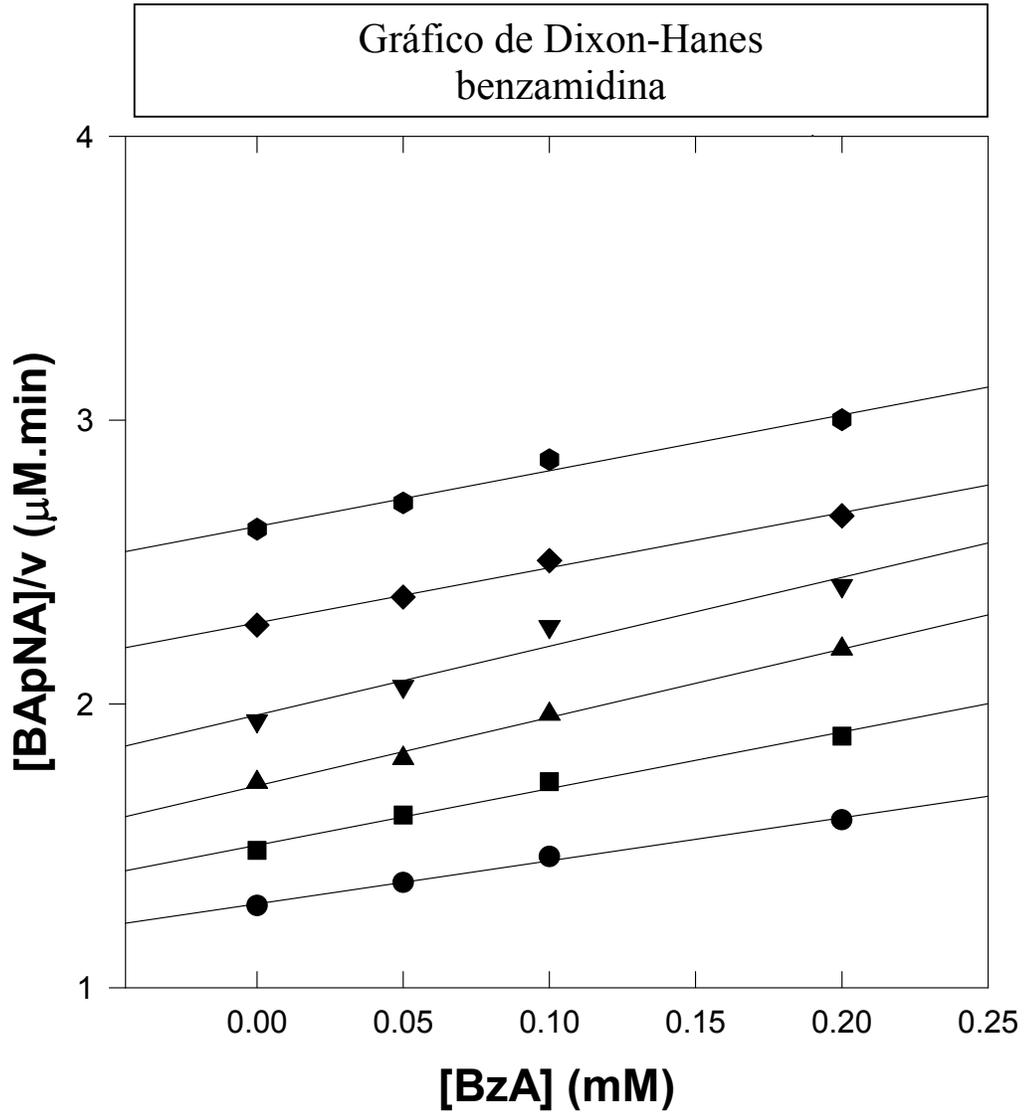


Figura 15- Gráfico de Dixon-Hanes para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina. [Bapna]: (●) 25 μM; (◆) 50 μM; (▼) 75 μM; (▲) 100 μM; (■) 125 μM; (●) 150 μM.

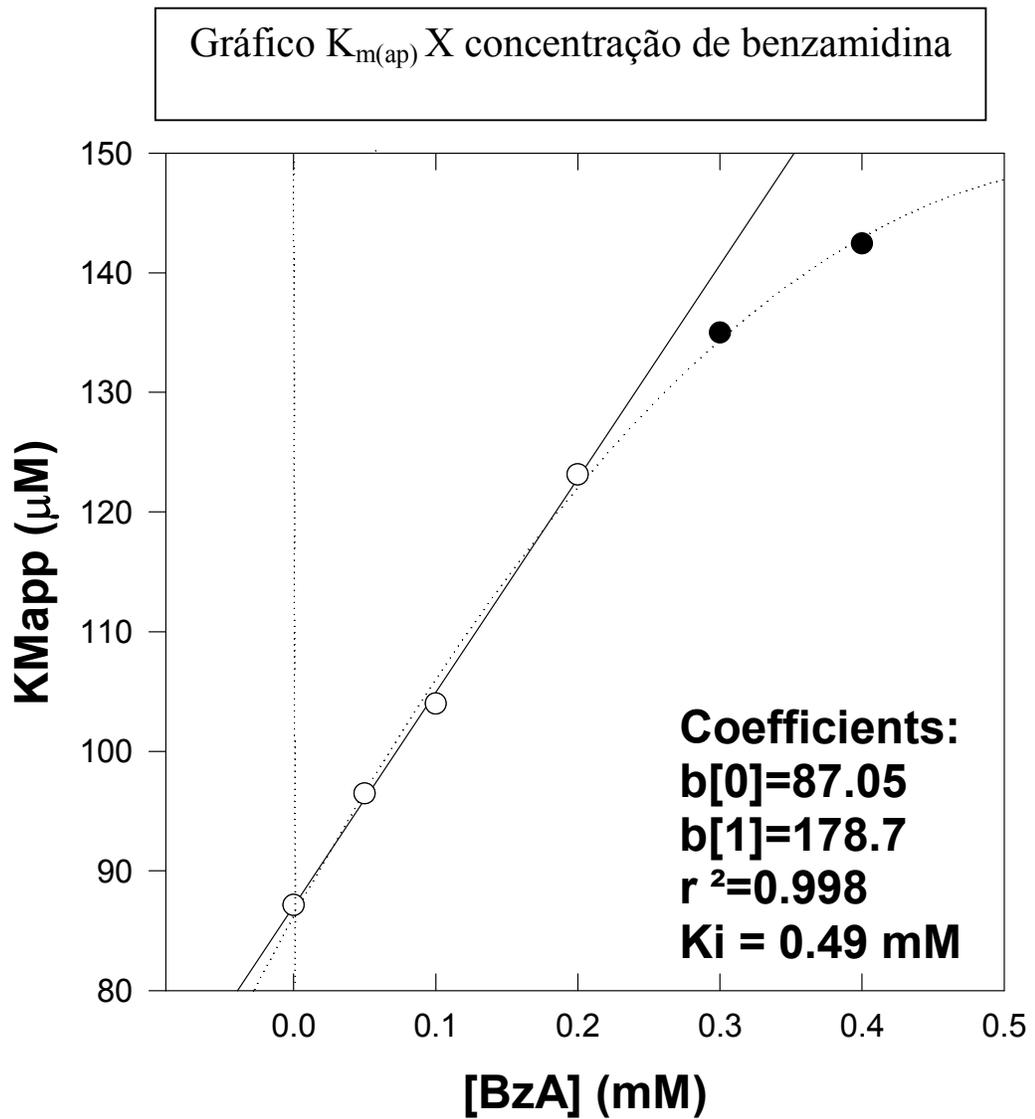


Figura 16- Gráfico Replot $K_{m(ap)}$ versus a concentração de BzA, para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina.

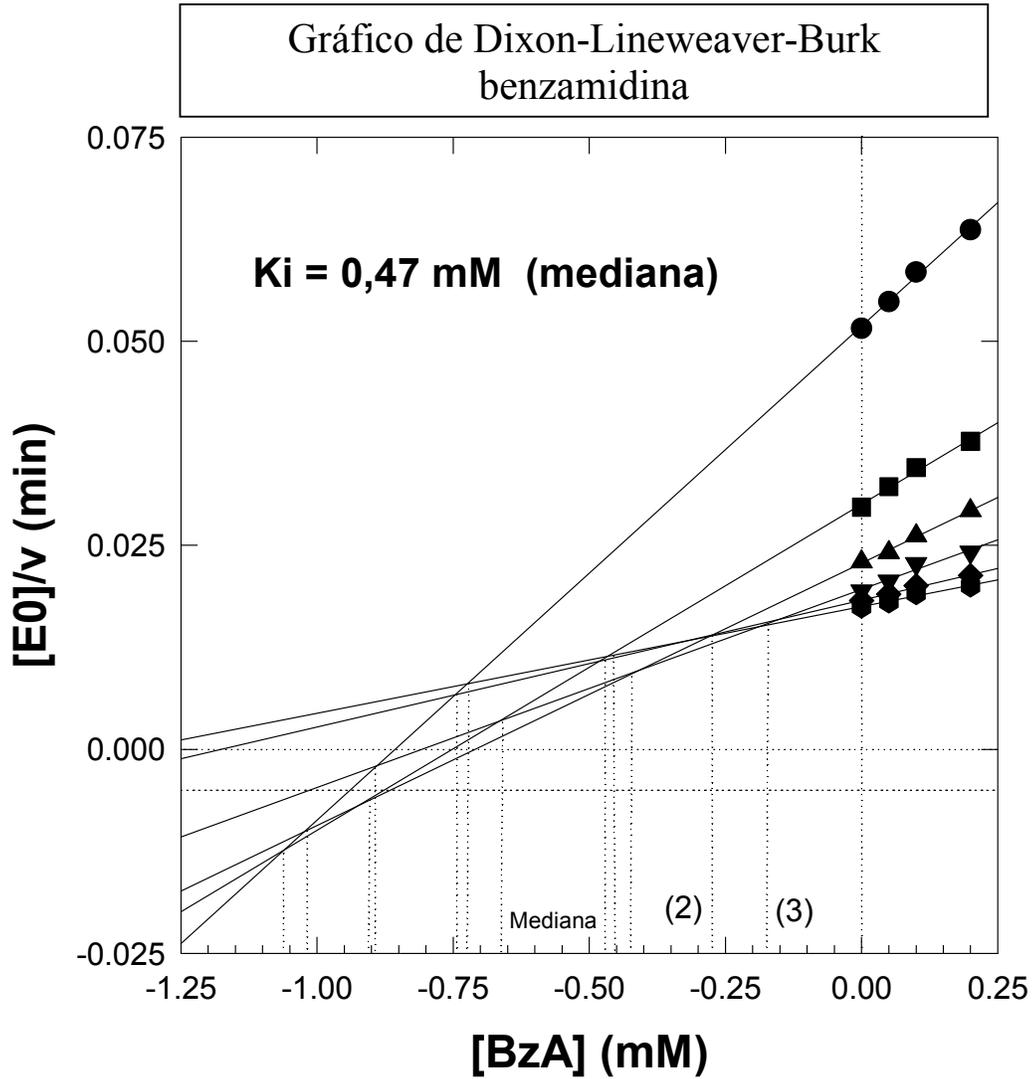


Figura 17- Gráfico de Dixon-Lineweaver-Burk para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da benzamidina. [Bapna]: (●) 25 μM ; (■) 50 μM ; (▲) 75 μM ; (▼) 100 μM ; (◆) 125 μM ; (●) 150 μM .

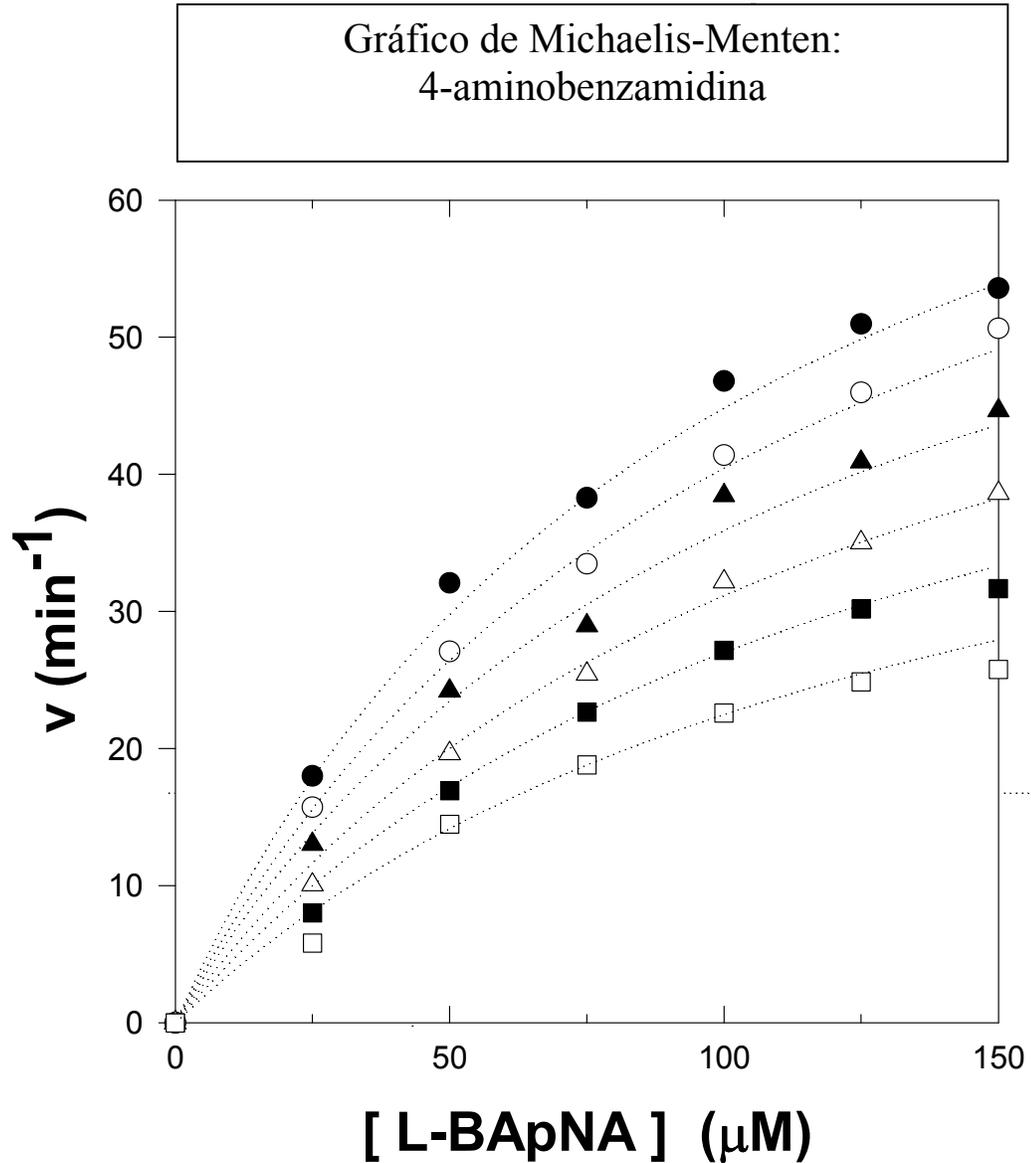


Figura 18- Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-aminobenzamidina: (●) ABZA = 0 mM; (○) ABZA = 0,05; (▲) ABZA = 0,10 mM; (Δ) ABZA = 0,20 mM; (■) ABZA = 0,30 mM; (□) ABZA = 0,40 mM.

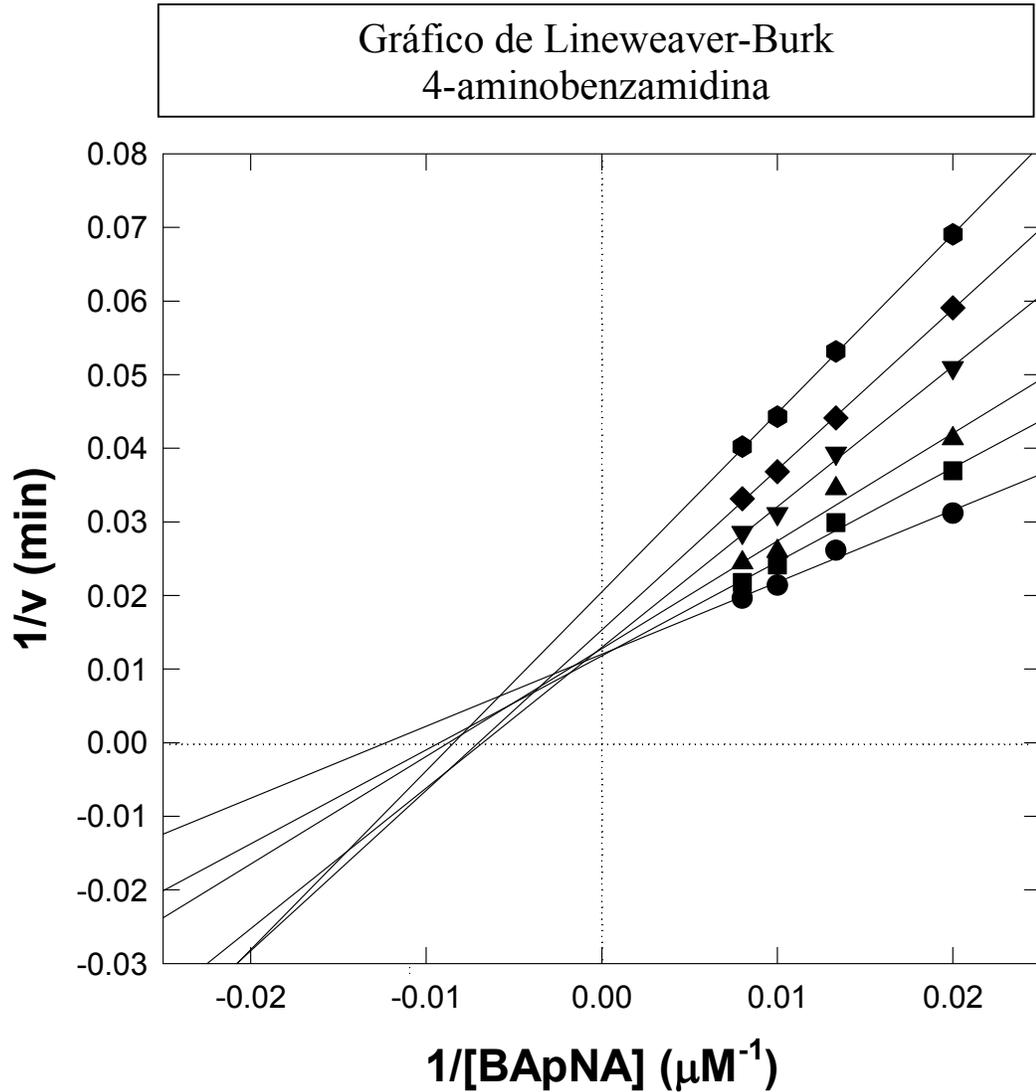


Figura 19- Gráfico de Lineweaver-Burk para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-aminobenzamidina: (●) ABzA = 0 mM; (■) ABzA = 0,05; (▲) ABzA = 0,10 mM; (▼) ABzA = 0,20 mM; (◆) ABzA = 0,30 mM; (●) ABzA = 0,40 mM.

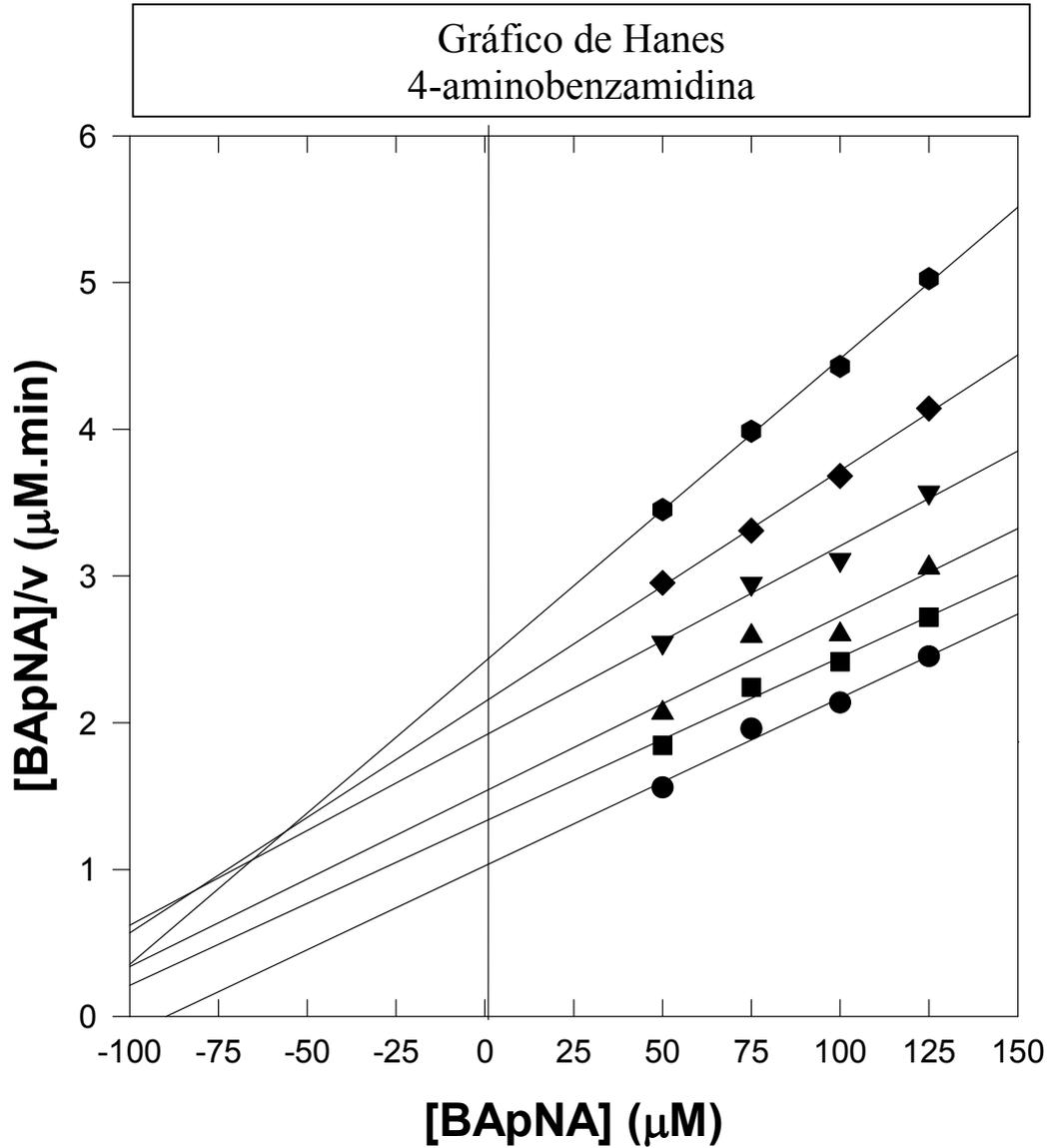


Figura 20- Gráfico de Hanes para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-aminobenzamidina: (●) ABZA = 0 mM; (■) ABZA = 0,05; (▲) ABZA = 0,10 mM; (▼) ABZA = 0,20 mM; (◆) ABZA = 0,30 mM; (●) ABZA = 0,40 mM.

Gráfico de Michaelis-Menten:
4-nitrobenzamidina

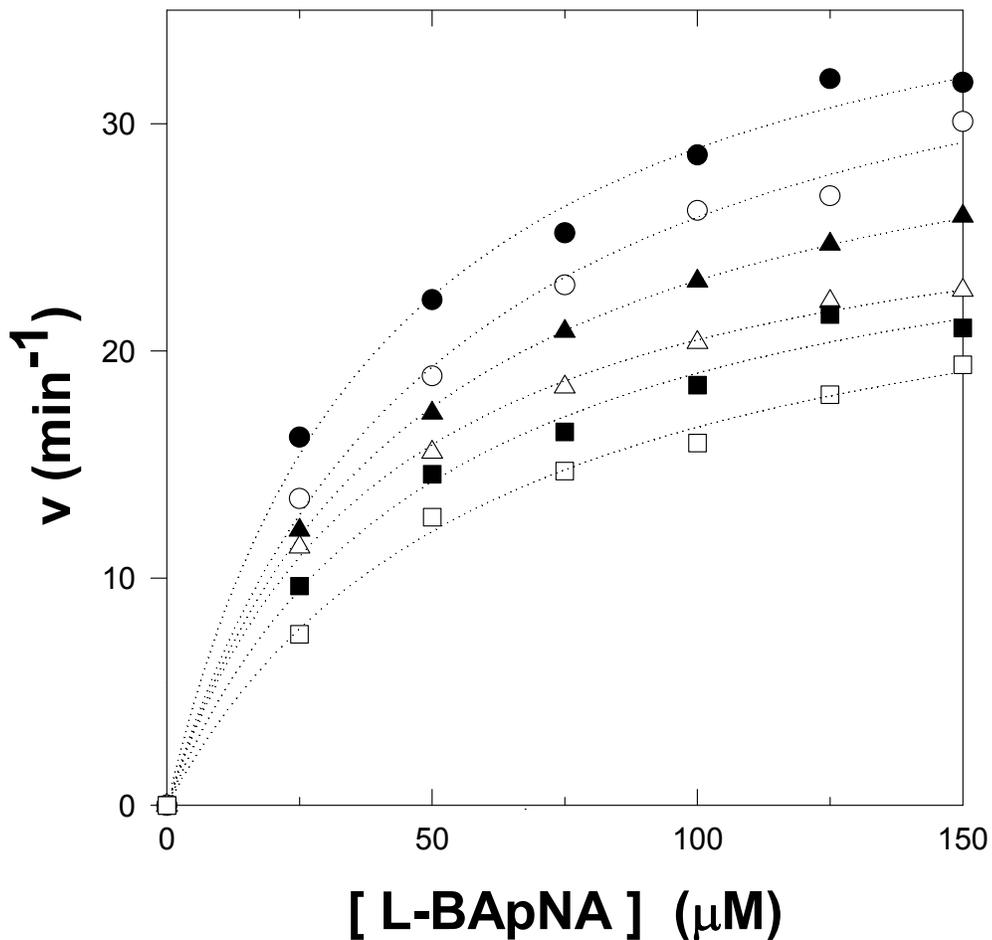


Figura 21- Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-nitrobenzamidina: (●) NBzA = 0 mM; (○) NBzA = 0,05; (▲) NBzA = 0,10 mM; (△) NBzA = 0,20 mM; (■) NBzA = 0,30 mM; (□) NBzA = 0,40 mM.

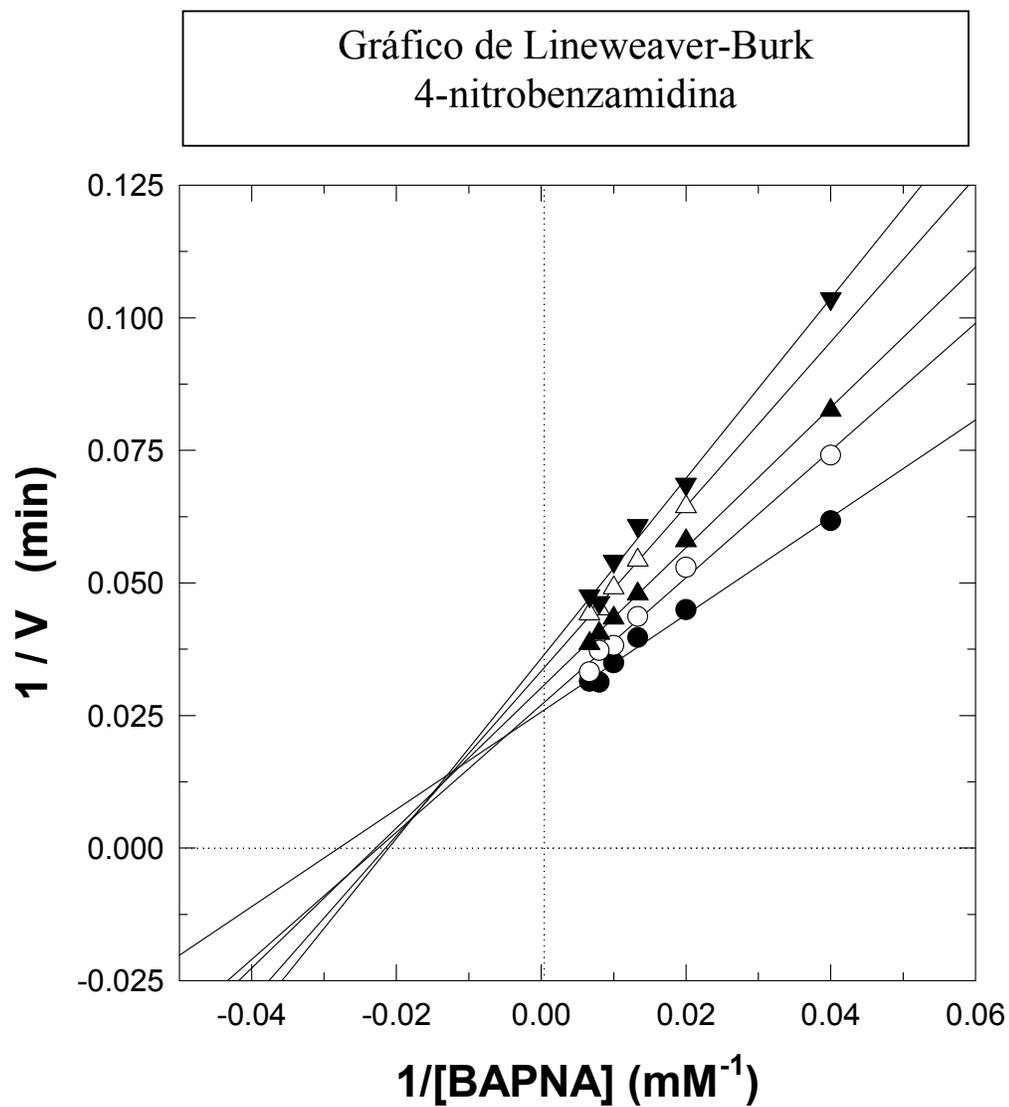


Figura 22- Gráfico de Lineweaver-Burk para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-nitrobenzamidina: (●) NBzA = 0 mM; (○) NBzA = 0,05; (▲) NBzA = 0,10 mM; (△) NBzA = 0,20 mM; (▼) NBzA = 0,30 Mm.

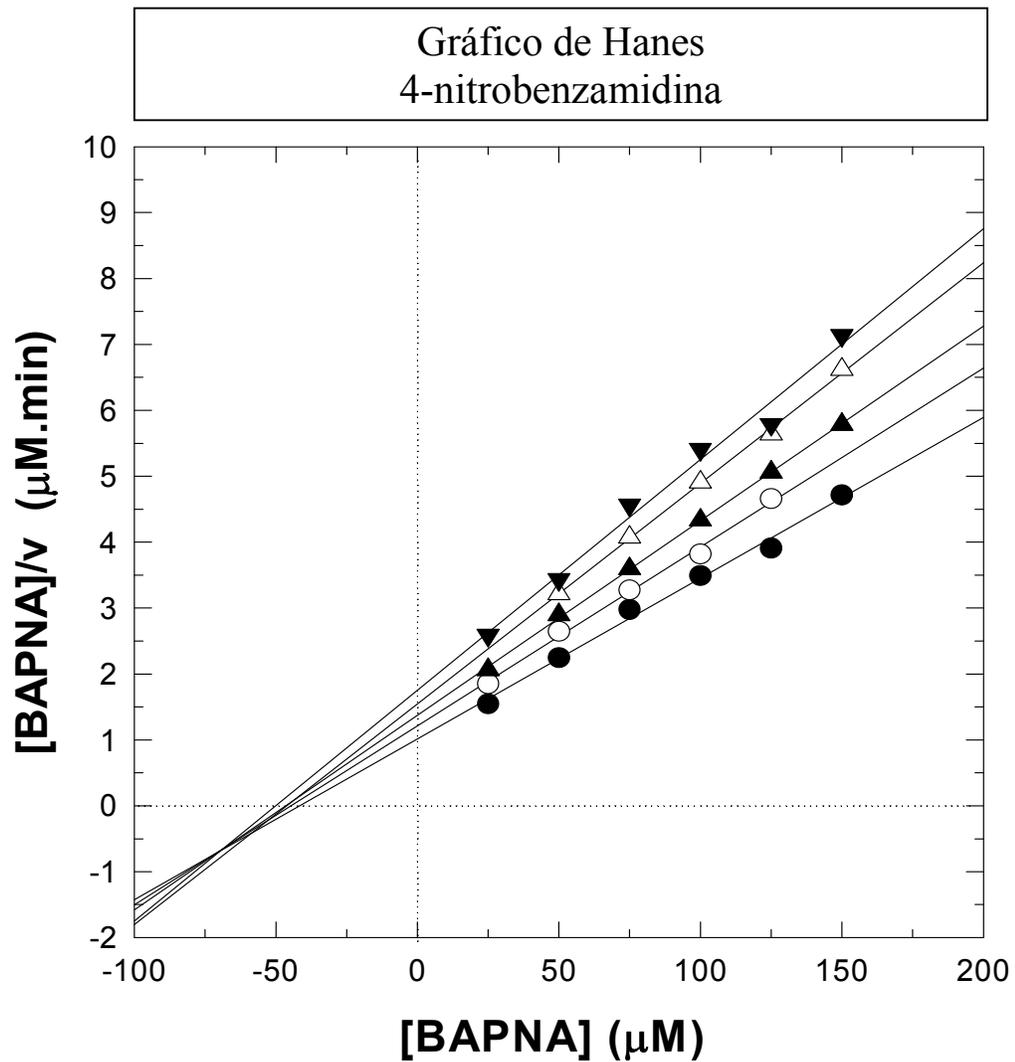


Figura 23- Gráfico de Hanes para os dados da hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalisada pela rK1 na ausência e na presença da 4-nitrobenzamidina: (●) NBzA = 0 mM; (○) NBzA = 0,05; (▲) NBzA = 0,10 mM; (Δ) NBzA = 0,20 mM; (▼) NBzA = 0,30 Mm.

10. DISCUSSÃO

10.1. Síntese e caracterização da 4-nitrobenzamidina

A síntese da 4-nitrobenzamidina foi realizada com sucesso, obtendo-se o produto puro, com rendimento de 66%, utilizando-se a metodologia de Pinner, (1958).

A caracterização da NBzA foi feita de maneira inequívoca, pela análise dos espectros no IV, RMN ^1H , análise elementar e medida da faixa de fusão.

Assim, no espectro no IV observaram-se as bandas 3400, 3250 e 3080 cm^{-1} características de deformação axial N-H do grupo amidínio. Em 1660, 1580 e 1500 cm^{-1} observou-se bandas relativas a deformação axial de C=N e de deformação angular do grupo amidínio sobrepostas às bandas de estiramento C=C de anel aromático. A presença do grupo nitro é evidenciada pelas bandas em 1500 e 1320 cm^{-1} , correspondendo, respectivamente, à deformação axial assimétrica e simétrica. Finalmente, observou-se uma banda em 850 cm^{-1} correspondente à deformação angular fora do plano de dois átomos de hidrogênio adjacentes, característica de anéis aromáticos 1,4- dissustituídos.

No espectro do RMN ^1H observou-se dois dupletos a 8,25 δ e 8,03 δ , correspondendo a dois átomos de hidrogênio cada um, com constante de acoplamento de 8,5 Hz confirmando a presença do anel aromático 1,4- dissustituído. O singleto largo em 6,65 δ correspondente a 3 átomos de hidrogênio indica a presença do grupo amidínio.

Os valores, da análise elementar, encontrados para a NBzA, diferem dos valores calculados em $\pm 0,4\%$, conferindo a identidade e pureza da substância.

A faixa de fusão observada 290 - 293°C está em concordância com o valor descrito por Saari *et al.*, (1978).

10.2. Purificação das amostras de rK1 (1) e rK1 (2)

Purificou-se a rK1 (1) e rK1 (2) até a homogeneidade, como observado na coluna de Superose 12 HR, segundo Sousa, (1993). O protocolo de purificação envolveu a preparação do extrato bruto, uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose seguida de uma cromatografia por afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina. Após as etapas de purificação o peso molecular e a pureza das amostras de rK1 (1) e rK1 (2) foram determinados pela cromatografia em coluna de Superose 12 HR em equipamento FPLC.

Não se comparam as purificações das calicreínas teciduais do rato rK1(1) e rK1(2) com a purificação da CSR observada por Sousa, (1993) porque os processos de purificação foram acompanhados utilizando-se substratos diferentes.

As atividades amidásicas específicas do extrato bruto e do material eluído na cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose eram determinadas com o substrato Bz-Arg-Nan em presença de 300,0 µg de SBTI, para eliminar a interferência de outras proteases presentes na glândula submandibular do rato que também pudessem hidrolisar o Bz-Arg-Nan. Segundo Pena, (1990), a atividade amidásica da rK1 sobre o Bz-Arg-Nan não é influenciada pela presença do SBTI.

10.3. Critérios de pureza e peso molecular aparente da rK1(1) e rK1 (2)

A homogeneidade das amostras de rK1 (1) e rK1 (2) purificadas foram comprovadas na cromatografia em coluna de Superose 12 HR 1/30.

O perfil da cromatografia das soluções de rK1 (1) e rK1 (2) purificadas na coluna de Superose 12 HR 1/30 mostrou um pico único, simétrico quanto à absorção em 280 nm e quanto à atividade amidásica, demonstrando, a homogeneidade da preparação enzimática (Figura 4).

Os pesos moleculares aparentes obtidos para a rK1 (1) e rK1 (2) 36200, determinados pela interpolação gráfica na reta mostrada na Figura 5 estão de acordo com os pesos moleculares aparentes 38761 e 36000, respectivamente, determinados e descritos por Pena (1990), e por Sousa (1993).

10.4. Caracterização cinética da rK1 com o substrato Bz-Arg-Nan e com os inibidores BzA, ABzA e NBzA

10.4.1. Parâmetros cinéticos K_m e k_{cat}

Os valores de K_m e k_{cat} para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan, catalizada pela rK1, $87,05 \pm 4,08 \mu\text{M}$ e $164,5 \pm 25,8 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. O valor do K_m , é diferente do valor descrito por Sousa (1993) $21 \mu\text{M}$. Por outro lado o valor do k_{cat} 162 min^{-1} é semelhante ao descrito por Sousa (1993), segundo Sousa, (1993) $550 \mu\text{L}$ incubados por 7 minutos e no presente trabalho $450 \mu\text{L}$ por 15 minutos.

10.4.2. Inibição pela BzA.

Como pode-se observar na Figura 12, gráfico de Michaelis-Menten, a BzA nas concentrações de 0,05 a 0,2 mM inibe a atividade amidásica da rK1 com o substrato Bz-Arg-Nan.

Para definir o tipo de inibição, foi desenhado o gráfico dos duplos recíprocos (Lineweaver-Burk) para os dados da Tabela II como mostrado na Figura 13. As retas obtidas não indicaram inibição competitiva como se esperava, uma vez que Silva *et al.* (1974) e Sousa (1993) demonstraram que a BzA inibia competitivamente a atividade amidásica das calicreínas urinária e submandibular de rato, respectivamente. O gráfico da Figura 13 sugeria indicava inibição mista. Para avançar no diagnóstico da inibição da atividade amidásica da rK1 pela BzA desenharam-se dois outros gráficos o de Hanes e o de Dixon- Hanes, como descrito por Cornish-Bowden (1981), Figuras 14 e 15, respectivamente.

A análise das Figuras indicou que a inibição da rK1 pela BzA, nas condições especificadas era competitiva.

Os gráficos de Hanes e Dixon-Hanes mostraram retas paralelas indicando fortemente tratar-se de inibição competitiva. As diferenças observadas entre os gráficos dos duplos-recíprocos e o de Hanes podem ser atribuídas a diferenças nos tratamentos dos dados. O gráfico dos duplos-recíprocos é mais sensível à erros experimentais enquanto que o gráfico de Hanes é menos sensível. Como não foi atribuído peso estatístico aos dados dos duplos recíprocos, isto pode ter causado o desvio no cruzamento das retas do eixo da ordenada para um ponto no 2º quadrante, indicando assim, inibição mista.

É possível que atribuindo o peso estatístico aos dados, para o cálculo das retas, do gráfico dos duplos-recíprocos, elas possam cruzar-se bem próximo ou mesmo sobre o eixo de $[E_0]/v$, indicando, também, a inibição competitiva.

A Figura 16 mostra o gráfico de K_m^{ap} versus $[I]$ para os dados obtidos na ausência e na presença de BzA (0,05 a 0,4 mM). Observa-se que os dados até a concentração de 0,2 mM de BzA encontram-se em uma linha reta. Os dados para as concentrações 0,3 e 0,4 mM de BzA desviam-se da reta. Estes resultados indicam que a BzA até a concentração de 0,2 mM comporta-se como inibidor competitivo da atividade amidásica da rK1. Já a BzA nas concentrações de 0,3 e 0,4 mM inibe a atividade amidásica de rK1 de maneira mais complicada. A definição deste outro tipo de inibição requer estudos mais aprofundados.

O valor do K_i para a BzA calculado a partir da linha reta mostrada na Figura 16 é de 0,49 mM.

Desenhou-se, também, o gráfico de Dixon-Lineweaver-Burk ($[E_0]/v$ versus $[I]$) para a inibição da atividade amidásica da rK1 na ausência e na presença de BzA nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,2 mM, respectivamente, como mostrado na Figura 17.

Baixando-se perpendiculares dos pontos de cruzamento de cada duas retas até o eixo das concentrações de BzA (eixo da abcissa), obtêm-se os respectivos valores das constantes de inibição K_i . Como pode-se observar na Figura 17 foram obtidas 15 perpendiculares indicando 15 pontos de cruzamentos. A mediana das 15 perpendiculares corresponde à 8ª mediana que chega ao eixo de concentrações de BzA no ponto correspondente a 0,47 mM, um valor bem próximo do valor de 0,49 mM calculado da reta da Figura 16.

O valor de K_i obtido no presente trabalho, para a inibição da atividade amidásica da rK1 pela BzA, 0,49 mM, difere dos valores de K_i obtidos por Silva *et al.*, (1974) 0,23 mM e Sousa (1993) 0,12 mM, para as inibições das atividades amidásicas das calicreínas urinária de rato e submandibular de rato, respectivamente.

Estas diferenças podem ser o resultado de diferenças nas condições experimentais. Sousa (1993) utilizaram nos ensaios de inibição da atividade amidásica da sua preparação de rK1 o substrato acetil-fenil-alanil-arginina-4-nitroanilida (Ac-Phe-Arg-Nan) um melhor substrato para a enzima do que o

Bz-Arg-Nan. Silva *et al.*, (1974) utilizaram como substrato o Bz-DL-Arg-Nan. Entretanto, nesse trabalho, as reações enzimáticas foram realizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, incubações durante 60 minutos a 37°C, diferentemente das condições utilizadas por Sousa (1993), cujas preparações foram incubadas durante 7 minutos. Neste trabalho, foram utilizados, tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, e as preparações foram incubadas durante 15 minutos a 37°C. Assim, o presente trabalho demonstra que a inibição da atividade amidásica da rK1 é competitiva até a concentração de 0,2 mM de BzA. Utilizando-se concentrações mais altas do inibidor, a inibição passa a ser de um tipo diferente, indicando assim que nas concentrações mais baixas de BzA o inibidor combina-se apenas no sítio ativo da enzima. Já na presença de concentrações mais altas do inibidor, este poderá combinar-se além do sítio ativo em um outro sítio, localizado na superfície da enzima.

Por outro lado, Sousa *et al.*, (2001) demonstraram a presença de um segundo sítio de ligação para o substrato na hK1, diferente do seu sítio ativo, nas hidrólises dos substratos D-Val-Leu-Lys-Nan e Tos-Arg-OMe, respectivamente catalizadas pela hK1. Com o substrato anilida em altas concentrações a enzima é ativada e com o substrato éster em altas concentrações a enzima sofre inibição.

A ativação enzimática pelo substrato foi demonstrada, também, para a serino protease tripsina pelo Tos-Arg-OMe por Trowbridge *et al.*, (1963) e pelo Bz-Arg-Nan por Nakata & Ishi, (1970) e Nakata & Ishi, (1972), Magalhães-Rocha *et al.*, (1980), Mares-Guia *et al.* (1981); Mares-Guia *et al.* (1981); e pelo D-Val-Leu-Arg-Nan por Oliveira *et al.*, (1993).

Estudos mais aprofundados das inibições da atividade amidásica da rK1 pela BzA, ABzA e NBzA podem levar à demonstração da existência de um segundo sítio de ligação na enzima como foi sugerido por Mares-Guia & Diniz, (1967).

A presença de uma segundo sítio de ligação na rK1, diferente do seu sítio ativo, foi descrita por Mares-Guia & Diniz (1970). Estes autores afirmaram que a calicreína urinária do rato apresentava um centro ativo constituído do sítio aniônico, sítio hidrofóbico e sítio catalítico e um sítio auxiliar, respectivamente. A hipótese da existência do sítio auxiliar era baseada em dados experimentais que indicavam a ativação da enzima na reação de hidrólise do substrato N- α -tosil-L-arginina metil éster (Tos-Arg-OMe) pelo próprio substrato.

A existência de um segundo sítio de ligação nas calicreínas teciduais foi, também, demonstrada, por Miranda *et al.*, (1995) e por Sousa *et al.*, (2001, 2002) para a calicreína tecidual humana (hK1). Miranda *et al.*, (1995) demonstraram que a inibição da hK1 pela aprotinina é bimodal. Em baixas concentrações do inibidor a inibição é competitiva. Nas concentrações mais altas do inibidor, este liga a um segundo sítio de ligação na enzima, diferente do sítio ativo e a inibição passa a ser competitiva parabólica. Sousa *et al.*, (2001) demonstraram que a inibição da hK1 pela BzA e pela ABzA é competitiva linear, o inibidor combina-se apenas no sítio ativo da enzima. Já a inibição da hK1 pela 4-NAn e An é mista, com o inibidor combinando-se, além do sítio ativo, em um segundo sítio de ligação diferente do sítio ativo.

10.4.3. Inibição pela ABzA

O gráfico de Michaelis-Menten para a inibição da atividade amidásica da rK1 pela ABzA, Figura 18, mostra que a ABzA inibe a enzima. O gráfico dos duplos-recíprocos, Figura 19, mostra retas que se cruzam no segundo e no terceiro quadrantes, sugerindo uma inibição do tipo mista ou mesmo de um tipo mais complexo. O gráfico de Hanes, Figura 20, para os dados da inibição mostra um perfil que também, sugere uma inibição mista ou mesmo um tipo de inibição mais complexo. Por isso, esta inibição deverá ser melhor estudada no futuro, para uma definição do seu comportamento.

A inibição competitiva da atividade amidásica de uma calicreína tecidual foi descrita por Silva *et al.*, (1974); que descreveram a inibição competitiva da atividade amidásica da calicreína urinária de rato por amidinas. Dentre as amidinas utilizadas pelos autores, a ABzA foi a que se comportou como o melhor inibidor da calicreína, com um K_i de 0,036 mM. Os autores utilizaram como substrato o Bz-Arg-Nan 0,4 mM e as incubações contendo 10 μ g de calicreína ocorreram em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, durante 60 minutos a 37°C. Sousa, (1993) também descreveu a inibição competitiva da atividade amidásica da calicreína submandibular de rato pela ABzA com o K_i de 0,021 mM. A autora utilizou o substrato Bz-Arg-Nan nas concentrações de 0,063 a 0,189 mM e as incubações contendo 11,3 nM de calicreína foram realizadas em tampão glicina-NaOH 0,2 M, pH 9,0, durante 7 minutos a 37°C.

10.4.4. Inibição pela NBzA

O gráfico de Michaelis-Menten para a inibição da atividade amidásica da rK1 pela NBzA, Figura 21, mostra que a NBzA inibe a enzima.

O gráfico dos duplos-recíprocos para os dados do gráfico de Michaelis-Menten mostrou retas que se cruzam em pontos diferentes no segundo quadrante, indicando, segundo Cornish-Bowden, (1981), inibição mista. Já o gráfico de Hanes, Figura 23, para os dados experimentais mostrou retas que se cruzam no terceiro quadrante indicando, segundo Cornish-Bowden, (1981), inibição mista.

Silva *et al.*, (1974) descreveram a inibição competitiva da calicreína urinária de rato pela NBzA. Os autores utilizaram como substrato o Bz-Arg-Nan 0,4 mM em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1 e incubações durante 60 minutos a 37°C. As constantes de inibição K_i reportados pelos autores para a BzA, ABzA e NBzA foram 0,036 mM, 0,024 mM e 0,420 mM, respectivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho para a inibição da atividade amidásica da rK1 pela NBzA por discordarem de dados da literatura devem ser repetidos para esclarecimento das discordâncias.

10.5. Comparação dos dados cinéticos com parâmetros cinéticos conhecidos da Tripsina

Mares-Guia & Shaw, (1965) mostraram a inibição competitiva da atividade amidásica da tripsina pelas amidinas benzamidina e a 4-aminobenzamidina. A 4-aminobenzamidina com $K_i = 8,25 \times 10^{-6}$ M foi o melhor inibidor seguida da benzamidina com $K_i = 1,84 \times 10^{-5}$ M. Eles utilizaram como substrato o Bz-DL-Arg-Nan.

Mares-Guia *et al.*, (1977) descreveram a inibição competitiva da tripsina pela benzamidina e por benzamidinas 4-substituídas. Os K_i 's reportados foram: para a benzamidina $K_i = 1,66 \times 10^{-5}$ M e para a 4-nitrobenzamidina $K_i = 22,71 \times 10^{-5}$ M e para a 4-aminobenzamidina $K_i = 0,83 \times 10^{-5}$ M. O melhor inibidor foi a 4-aminobenzamidina e a 4-nitrobenzamidina foi o pior inibidor. Os autores interpretaram os seus resultados afirmando que eles estão de acordo com um modelo que, por transferência intramolecular de elétrons, os substituintes doadores de elétrons, como a 4-aminobenzamidina, adquirem configuração dipolar, com uma carga parcial δ^+ no substituinte e uma carga parcial δ^- no anel aromático. Já os substituintes retiradores de elétrons, como a 4-nitrobenzamidina, geram um dipolo de polaridade oposta, com uma carga parcial δ^- no substituinte e uma carga parcial δ^+ no anel aromático. Assim, compostos como a 4-aminobenzamidina e 4-nitrobenzamidina são capazes de interagirem de modos diferentes com a tripsina, de acordo com sua carga parcial. A 4-aminobenzamidina é capaz de interagir com um determinado sítio da enzima com uma carga residual negativa reforçando a ligação do inibidor ao centro ativo da enzima. Por outro lado, o composto 4-nitrobenzamidina gera uma repulsão dipolo-dipolo entre o substituinte através de sua carga parcial, negativa, enfraquecendo assim a ligação do inibidor ao centro ativo da enzima.

Evans *et al.*, (1981) no estudo do complexo fluorescente formado pela ligação da 4-aminobenzamidina com o centro ativo das serino proteases,

confirmaram que a molécula apresentava-se como inibidor competitivo e ocupava especificamente o centro ativo de várias serino proteases, como a trombina, a tripsina, a elastina e outras.

Talhout & Engberts (2001), pela análise termodinâmica da ligação de benzamidas 4-substituídas à tripsina mostraram que a relativa magnitude das constantes de inibição, é determinada pela capacidade do substituinte de doar elétrons. A benzamida 4-substituída mais polar foi a molécula que apresentou melhor comportamento como inibidor competitivo da tripsina.

Junqueira et al., (1992) descreveram a inibição competitiva parabólica da tripsina bovina por bis-benzamidas. Os autores interpretaram os resultados como sendo devido a ligação do inibidor com dois sítios na enzima, um o seu sítio ativo e o outro um sítio de ligação secundária.

11. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

1- A 4-nitrobenzamidina foi sintetizada e caracterizada.

2- A calicreína tecidual do rato (rK1) foi purificada a partir de um pó liofilizado de glândulas submandibulares de ratos Wistar.

3- Os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} para a hidrólise do substrato Bz-Arg-Nan catalizada pela rK1 foram determinados.

4- O estudo da inibição da atividade amidásica da rK1 pela BzA, ABzA e NBzA foi realizado. A BzA em baixas concentrações (0,05, 0,10 e 0,20 mM) mostrou ser um inibidor competitivo da rK1 com K_i de 0,47 mM. A ABzA e a NBzA mostraram-se, também, serem inibidores da rK1. Entretanto os tipos de inibição não puderam ser definidos uma vez que a quantidade da enzima disponível foi insuficiente.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHLEY, P.L. and MACDONALD, R. J. Kallikrein-related mRNA of the rat submaxillary gland. Nucleotide sequence of four distinct types including tonin. **Biochemistry**. v 24, p 4512-4520, 1985a.

ASHLEY, P.L. and MACDONALD, R. J. Tissue-specific expression of kallikrein-related genes in the rat. **Biochemistry**. v 24, p 4520-4557, 1985b.

BHOOLA, K. D. And OGLE, C. W. Subcelular localization of kallikrein, amylase and acetylcoline in the submaxillary gland of guinea-pig. **J. Physiol**. v 184, p 663, 1966.

BHOOLA, K. D. And SHACHTER, M.. In some properties of Kallidin, bradykinin and venom Kinin. In: **polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels**. Pergamom Press, p 232-246, 1960 Ed by M. SHACHTER, OXFORD, UK.

BHOOLA, K.D.; FIGUEROA , C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Res**. v 44, p 1-80, 1992.

BOCK, P. E. , SHORE, J. D., TANS, G. and GRIFFIN, J.H. Protein-protein interactions in contact activation of blood coagulation. **J. Biol. Chem**. v 260, p 12434-12443, 1985.

BOUCHER, R.; ASSELIN, J.; GENEST, J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. **Circ. Res**. v 34, p 203-209, 1974.

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

BRADY, J.M. & MACDONALD, R.J. The expression of two kallikrein gene family members in the rat kidney. **Arch. Biochem. Biophys**. v 278, p 342-349, 1990.

BRADY, J.M.; WINES, D.R.; MACDONALD, R.J. Expression of two kallikrein gene family members in rat prostate. **Biochemistry**. v 28, p 5203-5210, 1989.

BRANDTZAEG, P.; GAUTVIK, K.M.; NUSDAT, K.; PIERCE, J.V. Rat submandibular gland kallikreins: purification and cellular localization . **Br. J. Pharmac**. v 56, p.155-167, 1976.

BRANDZAEG, P.; GAUTVIK, K. M.; NUSTAD, K.; PIERCE, J. V. Rat submandibulary gland kallikrein purification and cellular localization. **Br. J. Pharmacol.** v 56, p 155-167, 1975.

CHAGAS, J. R.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, M. A.; XIONG, W.; WANG, C.; CHAO, L.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Substrate specificities of tissue kallikrein and T-kininogenase; their possible role in kininogen processing. **Biochemistry.** v 31(21), p 4969-4974, 1992.

CHAO, J. & CHAO, L. Rat urinary kallikrein. **Methods Enzymol.** 163: 128-143, 1988.

CHAO, J.; CHAO, L.; MARGOLIUS, H. S. Isolation of tissue kallikrein in the rat spleen by monoclonal antibody-affinity chromatography. **Biochim. Biophys. Acta.** v 801, p 244-249, 1984.

CHAO, J.; MARGOLIUS, H. S. Isozymes of the rat urinary kallikrein. **Biochemical Pharmacol.** v 28(13), 2071-2079, 1979.

CHEN, Y. P.; CHAO, J.; CHAO, L. Molecular cloning and characterization of two rat renal kallikrein genes. **Biochemistry.** v 27, p 7189-7196, 1988.

CLEMENTS, J. A. The glandular kallikrein family of enzymes tissue-specific expression and hormonal regulation. **Endocrine Rev.** v 10, p 393-419, 1989.

CORNISH-BOWDEN, A. Inhibitors and activators, In: Cornish-Bowden, A. (editor). **Fundamentals of enzyme kinetics.** Butterworth Co., Ltda., London. p 73-81, 1981.

DRINKWATER, C. C.; EVANS, B. A.; RICHARDS, R. Kallikreins kinins and growth factor biosynthesis. **Trends in Biochem.Sci.** v 13, p 26-37, 1978.

E. DI CERA; Q. D. DANG & Y.M. AYALA. Molecular mechanisms of thrombin function cellular and molecular. **Life Sci.** v 53, p 701-730, 1997.

EL-THAHER, T.S.; SAED, G.M.; AL-HAMIDI, A. A.; BAILEY, G.S. Characterization of kallikrein isolated from rat submandibular glands by a simple and rapid purification procedure. **Agents Actions Suppl.** v 38, p 98-105, 1992.

EL-THAHER, T.S.; SAED, G.M.; BAILEY G.S. A simple and rapid purification of kallikrein from rat submandibular gland. **Biochim. Biophys. Acta.** v 1034, p 157-161, 1990.

ERDÖS, E. G.; TAGUE, L. L.; MIWA, I. Kallikrein in granules of the submaxillary gland. **Biochem. Pharmacol.** v 17, p 667-674, 1968.

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

EVANS, B. A.; DRINKWATER, C. C.; RICHARDS, R. I. Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. **J. Biol. Chem.** v 262, p 8027-8034, 1987.

EVANS, S.; STEVEN, O.; SHORE, J. D. 4-aminobenzamidine as a fluorescent probe for the active site of serine protease. **J. Biol. Chem.** v 257, p 3014-3017, 1981.

FIEDLER, F. & FRITZ, H. Striking structural similarity of pig pancreatic kallikrein, mouse nerve growth factor gamma-subunit and rat tonin. **Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.** v 362, p 1171-1175, 1981.

FREY, E. K.; KRAUT, H. & WERLE, E. Über die blutzuckersenkende Wirkung des Kallikrein (Padutins). **Klin. Wochenschr.** v 11, p 846-849, 1932.
GEIGER, R. & FRITZ, H. Human urinary kallikrein. **Methods Enzymol.** v 80; p 446-492, 1981.

GERALD, W.L.; CHAO, J. & CHAO, L. Immunological identification of rat tissue kallikrein cDNA and characterization of the kallikrein gene family. **Biochim. Biophys. Acta** v 866, p 1-14, 1986.

GUTKOWSKA, J.; THIBAUT, G.; CANTIN, M.; GARCIA, R.; GENEST, J. Kallikrein concentration in submandibular glands of rats chronically treated with isoproterenol. **Canad. J. Physiol. and Pharmacol.** v 61(5), p 449-456, 1983.

HABERMAN, E. Kininogens. In: ERDOS, G. E.; WILDE, A. F. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol XXV, p 250-288, 1970.

HAGIWARA Y.; KOJIMA M.; HAYASHI I.; OHISHI, S. Demonstration of derivation of rat urinary bradykinin from plasma low-molecular-weight kininogen: a study using kininogen-deficient rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v 204, p 1219-1224, 1994.

HIROYASU, N.; SHIN-ICHI, I. Substrate activation in the trypsin-catalyzed hydrolysis of benzoyl-L-arginine p-nitroanilide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v 41(2), 393-400, 1970.

HONORATA C. & JACEK O. Structural and energetic determinants of the S₁-site specificity in serine proteases. **Eur. J. Biochem.** v 260, p 571-595, 1999.

INOUE, H.; FUKUI, K.; MIYAKE, Y. Identification and structure of rat true tissue kallikrein gene expressed in the kidney. **J. Biochim.** Tokyo v 105, p 834-840, 1989.

JUNQUEIRA R.G., SILVA E. and MARES-GUIA M. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v 25, p 873-887, 1992.

KATO, H., ENJYOJI, K., MIYATA, T., HAYASHI, I., OH-ISHI, S. and IWANAGA, S. Demonstration of arginyl-bradykinin moiety in rat HMW kininogen: direct evidence for liberation of bradykinin by rat glandular kallikreins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v 127, p 289-295, 1985.

KRAUT, H.; FREY, E. K.; WERLE, E. Der nachweis eines kreislau hormons in der pankreasdrüse. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.** v 189, p 97-106, 1930 apud SHACHTER, M. Kallikrein (kininogenases) – A group of serine proteases with bioregulatory actions. **Pharmacol. Review.** v 31, p 1-17, 1980.

LAZURE C.; SEIDAH, N.G., THIBAUT G., BOUCHER R., GENEST J. and CHRETIEN M. Sequence homologies between tonin, nerve growth factor gamma-subunity, epidermal growth factor-binding protein and serine proteases. **Nature**, v 292(5821), p 383-384, 1981.

LIAO, D., BREDDAM, K., SWEET, R.M., BULLOCK, T. and REMINGTON, S.J.. Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2 Å resolution. **Biochemistry.** v 31, p 9796–9812, 1992.

MA, J. X.; CHAO, J.; CHAO, L. Molecular cloning and characterization of rKLK10, a cDNA encoding T-kininogenase from rat submandibular gland and kidney. **Biochemistry.** v 31, p 10922-10928, 1992.

MACDONALD, R. J.; MARGOLIUS, H. S.; ERDOS, E. G. Molecular biology of tissue kallikrein. **Biochem. J.** v 253, p 313-321, 1988.

MAGALHÃES-ROCHA N.M., ROGANA E. and MARES-GUIA M. Kinetic parameters for the activation of α - and β -trypsins by the methyl Ester of tosyl-L-arginine (Tos-L-Arg-OMe). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v 200, p 61-64, 1980.

MAITRA, S.R., CARRETERO, O.A., SMITH, S.W., RABITO, S.F. Role of calcium and calmodolin in release of kallikrein and tonin from rat submandibular gland. **American Journal of Physiology**, v 250, p CA 80-85, 1986.

MARES-GUIA M. and DINIZ C.R. The active center of the kallikreins. In: Bradykinin, kallidin and kallikrein. Erdös E.G. and Wilde A.F. editors. **Handbook of Experimental Pharmacology** v XXV: 141-145; Springer-Verlag, New York, 1970.

MARES-GUIA M., ROGANA E., AMORIM A. F. and MAGALHÃES-ROCHA N. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. **The Journal of Biological Chemistry**, v 256, p 1661-1668, 1981.

MARES-GUIA, M. & DINIZ, C. R. Studies on the mechanism of rat urinary kallikrein catalysis, and its relation to catalysis by trypsin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v(3) 121, p 750-756, 1967.

MARES-GUIA, M. & FIGUEIREDO, A. F. S. Thermodynamics of the hydrophobic interaction in the active center of trypsin investigation with amidines and guanidines. **Biochemistry**. v 9, p 3223-3227, 1970.

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

MARES-GUIA, M.; NELSON, D. L.; ROGANA, E. Electronic effect in the interaction of 4-substituted benzamidines with trypsin: the involvement of the π -electronic density at the central atom of the substituent in binding. **J. Am. Chem. Soc.** v 99, p 2331-2336, 1977.

MARQUART, M.; WALTER, J.; DEISENHOFER, J.; BODE, W. and HUBER, R. The geometry of the reactive site and of the peptide groups in trypsin, trypsinogen and its complexes with inhibitors. **Acta Cryst. Section B.** v 39, p 480-490, 1983.

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

MCCONNELL, D. J.; MASON, B. The isolation of human plasma prekallikrein. **Br. J. Pharmacol.** v 38(3), p 490-502, 1970.

MIRANDA, T.L.S.; RAMOS, C.H. I.; FREIRE, R.T.S.; SOUSA, E. P.; ROGANA, E.; SANTORO, M. M.; FIGUEIREDO, A. F. S. Kinect machanism of the inibition of human uryrary kallikrein by basic pancreatic trypsin inhibitor. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v 28, p 505-512, 1995.

MÜLLER-ESTERL, W., IWANAGA, S. and NAKANISHI, S. Kininogens revisited. **Trends in Biochem. Sci.** v 11, p 336-339, 1986.

NAKATA H. and ISHII S. Substrate activation in the trypsin-catalyzed hydrolysis of benzoyl-L-arginine p-nitroanilide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v 41, p 3939-400, 1970.

NAKATA H. And ISHI S.I. Substrate activation of trypsin and acetyl trypsin caused by α -N-benzoyl-L-arginine p-nitroanilide. **Journal of Biochemistry** v 72, p 281-290, 1972.

NEURATH, H. . Evolution of proteolytic enzymes. **Science.** v 224, p 350–357, 1984.

OLIVEIRA M.G.A., ROGANA E., ROSA J.C., REINHOLD B., ANDRADE M. H., GREENE L. J. and 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.

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, J. L. and MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 Is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidine and kinect characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)azo- β -trypsin. **J. Biol. Chem.** v 268, p 26893-26903, 1993.

PATRIDGE, M. W. & SHORT, W. F. Preparation of amidines from cyanides and ammonium thiocyanate or substituted ammonium thiocyanates. **Amidines, part IV.** v 78, p 390-394, 1968.

PENA, H. B. Caliceína de glândulas submandibulares de rata: purificação completa e caracterização. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, 1990.

PINNER, M. Nitrilas-Amidinas. **J.A.C.S.** v 80, p 591-598, 1958.

POWERS, C. A. Trypsin activation, partial characterization, and distribution of kallikrein-like and thrombin-like protease in the neurointermediate lobe of the rat pituitary. **J. Neurochem.** v 47, p 145-153, 1986.

QIU, X., CULP, J.S., DILELLA, A.G., HELLMIG, B., HOOG, S.S., JANSON, C.A., SMITH, W.W. and ABDEL-MEGUID, S.. Unique fold and active site in cytomegalovirus protease. **Nature.** v(7) 383, p 275–279, 1996.

REICH, E.; RIFKIN, D.B. & SHAW, E. Proteases and Biological Control. **Cold Sp. Har. Lab. Press.** v 76, p 986-993, 1975.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T. and ROSENFELD, G.. Brakinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma

globulins by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.** v 156, p 261-273, 1949.

SAARI, W. S.; FREEDMAN, M. B.; HUFF, J. R.; KING, S. W.; RAAB, A. W.; BERGSTRAND, S. J.; ENGELHARDT; Trichloroacetamidines, a new class of positive inotropic agents. **J. Med. Chem.** v 21(12), p 1283-1290, 1978.

SCHACHTER, M. Kallikreins (kininogenases). A group of serine proteases with bioregulatory actions. **Pharmacol. Rev.** v(1) 31, p 1-17, 1980.

SCHECHTER, I. and BERGER, A. On the size of the active site in protease papain. **Biochem. Biophys. Res. Comun.** 27, p 157-162, 1967.

SHACHTER, M. and THAIN, E. M.. Chemical and pharmacological properties of the potent, slow contracting substance (kinin) in vasp venom. **Br. J. Pharmacol.** v 9, p 352, 1954.

SHAI, S. Y.; WOODLEY-MILLER, C.; CHAO, L.; CHAO, J. Characterization of genes encoding rat tonin and a kallikrein-like serine protease. **Biochemistry.** v 28, p 5334-5343, 1989.

SHIMOJO, N.; CHAO, J.; CHAO, L.; MARGOLIUS, H. S.; MAYFIELD, R. K. Identification and characterization of a tissue kallikrein in rat skeletal muscles. **Biochem. J.** v 243, p 773-778, 1987.

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

SOUSA M. O., MIRANDA T.L.S., COSTA E. B., BITTAR E. R., SANTORO M. M. and FIGUEIREDO A. F. S. Linear competitive inhibition of human tissue kallikrein by 4-aminobenzamide and benzamide and linear mixed inhibition by 4-nitroaniline and aniline. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v 34, p 35-44, 2001.

SOUSA M. O., MIRANDA T.L.S., MAIA C. N., BITTAR E. R., SANTORO M. M. and FIGUEIREDO A. F. S. Kinetics peculiarities of human tissue kallikrein:1-substrate activation in the catalyzed hydrolysis of H-D-valyl-L-leucyl-arginine 4-nitroanilide and H-D-valyl-L-leucyl-L-lysine 4-nitroanilide; 2-substrate inhibition in the catalyzed hydrolysis of N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v 400, p 7-14, 2002.

SOUSA, M. O. Caracterização cinética da calicreína de glândulas submandibulares de rato com substratos sintéticos N- α -derivados da arginina e

inibidores naturais e sintéticos. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, 1993.

SOUSA, M. O.; SANTORO, M. M.; FIGUEIREDO, A. F. S. The effect of cations on the amidase activity of human tissue kallikrein: 1-Linear competitive inhibition by sodium, potassium, calcium and magnesium. 2-Linear mixed inhibition by aluminium. **J. Enz. Inh Med. Chem.** v(4) 19, p 317-325, 2004.

SOUSA, M.O.; RODRIGUES, C.V.; PENNA, 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 α -substituted arginine 4- nitroanilides and N α -benzoyl-L-arginine ethyl ester as substrates. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v 29, p 327-334, 1996.

SWIFT, G. H.; DAGORN, J. C.; ASHLEY, P. L.; CUMMINGS, S. W.; MACDONALD, R. J. Rat pancreatic kallikrein mRNA: nucleotide sequence and amino acid sequence of the encoded preproenzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v 79, p 7263-7267, 1982.

TADASHI INAGAMI; The mechanism of the specificity of trypsin catalysis. I-Inhibition by alkyl ammonium ions. **The J. Biol. Chem.** v(12) 239, p 787-791, 1964.

TALHOUT R. and ENGBERTS J. B. Thermodynamic analysis of binding of *p*-substituted benzamidines to trypsin **Eur. J. Biochem.** v 268, p 1554-1560, 2001.

TALHOUT R. and ENGBERTS J.B.F.N. Thermodynamic analysis of binding of *p*-substituted benzamidines to trypsin. **European Journal of Biochemistry**, v 268, p 1554-1560, 2001.

TROWBRIGDE, C.G.; KREHBIEL, A.; LASKOWSKI, M. Substrate activation of trypsin. **Biochemistry**. v 2(4), 843-850, jul, 1963.

VOGEL, A. L. **Análise Orgânica Quantitativa**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Ao livro técnico., 1977. p 185-186.

WANG, J., HARTLING, J.A. and FLANAGAN, J.. The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. **Cell.** v(91) p 447-456, 1997.

WEBSTER, M. E. and PIERCE, J.V. Studies on plasma kallikrein and its relationship to plasmin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v 130, p 484-491, 1960.

WEBSTER, M.E. Kallikrein in glandular tissues. In: Erdos E.G. and Wilde (Eds) **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin: Springer-Verlag, 1970, v 25, 768p., p 131-135 e 659-665.

WERLE, E.; BEREKE, U. Zur kenntnis des kallikreins. **Angew. Chem. Int.** 60A: 53,1948.

WERLE, E.; GOTZE, W.; KEPLER, A.. Uber die wirkung des kallikreins auf den isolerten darm über eine neue darmkontrahierende substanz. **Biochem. Z.** v(12) 289, p 217-233, 1937.

WINES, D. R.; BRADY, J. M.; PRITCHETT, D. B.; ROBERTS, J. L.; MACDONALD, R. J. Organization and expression of the rat kallikrein gene family. **J. Biol. Chem.** v 264, p 7653-7662, 1989.

WINES, D. R.; BRADY, J. M.; SOUTHARD, E. M. and MACDONALD, R. J. Evolution of the rat kallikrein gene family. Gene conversion leads to functional diversity. **J. Mol. Evol.** v 32, p 476-492, 1991.

XIONG, W.; CHEN, L.; CHAO, J. Purification and characterization of a kallikrein-like T-cininogenase. **J. Biol. Chem.** v 265, p 2822-2827, 1990.

YOUSEF, G. M. & DIAMANDIS, E. P. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway. **Biol. Chem.** v 383, p 1045-1057, 2002.