



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FORMAS REDUZIDAS DE INIBIDOR BOWMAN-BIRK,  
BIODISPONIBILIDADE EM ÍLEO ISOLADO DE  
CAMUNDONGO E ATIVIDADE NO PROTEASSOMA**

**AUTORA: LARISSA LOVATTO AMORIN  
ORIENTADOR: PROF. Dr. MILTON HÉRCULES GUERRA DE ANDRADE  
COORIENTADOR: PROF. Dr. WILLIAM DE CASTRO BORGES**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

**Ouro Preto - MG, junho de 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

*Este trabalho foi realizado no LABORATÓRIO DE ENZIMOLOGIA E BIOFÍSICA - ICEB/NUPEB/UFOF, com auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).*

*Dedico esta dissertação aos meus pais e ao meu irmão Rafael, que muito me incentivaram nessa caminhada de estudos em Ouro Preto e por sempre me apoiarem em minhas decisões.*

*“Você tem que cantar como se não precisasse de dinheiro, amar como se você nunca fosse se ferir. Você tem que dançar como se ninguém estivesse olhando. Isso tem que vir do coração, se você quer que dê certo.”*

*(Susannah Clark)*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus por estar comigo em todos os momentos, ensinando-me que com fé e perseverança é possível vencer todos os obstáculos;*

*Ao Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade, pela orientação, amizade e pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho, bem como pelos grandes ensinamentos de vida que levarei comigo para sempre. Não posso deixar de agradecer também às inúmeras caronas para Belo Horizonte;*

*Ao Prof. Dr. William de Castro Borges pela coorientação, pela solicitude e apoio constante para a realização deste trabalho;*

*Ao meu querido pai, Joaquim Adelson, pelas palavras de carinho e incentivo, pelo amparo, meu verdadeiro “porto seguro”;*

*À minha querida mãe, Maria do Carmo, por todas as conversas com risadas e lágrimas, pelas orações, pela sabedoria nas palavras de conforto. Por me ensinar que paciência, força e coragem são necessárias para se alcançar objetivos na vida;*

*Ao Rafael, meu querido irmão, por todas as assistências de informática, pelas várias caronas e pelo estímulo nessa trajetória;*

*Ao meu namorado, Daniel, pessoa muito especial, pelo apoio, incentivo e compreensão, principalmente na fase final deste trabalho;*

*A todos os meus familiares e amigos, especialmente meu tio Mauro, pela confiança que depositaram em mim e pela compreensão nas minhas ausências durante os encontros realizados nesses últimos dois anos;*

*À amiga Lillian, pela amizade verdadeira, “conversas e mais conversas” e pelos momentos que passamos juntas em Ouro Preto, sem me esquecer do apoio do André;*

*Ao João Victor, pela amizade e companheirismo;*

*Ao Roenick, pela amizade, conversas e desabafos no corredor e pelo auxílio na formatação deste trabalho;*

*A todos os colegas e amigos do Laboratório de Enzimologia e Biofísica: Alessandra, Brunno, Carol, Fabiana, Flávia, Karina, Luisa, Marcelo, Marina, Priscila, Raquel, Sonaly, Vinicius, e aos antigos Jonathan, Melina e Paula, pelo convívio e participação direta ou indiretamente neste*

trabalho. Agradeço, em especial, ao Ivan, pela amizade, pela dedicação ao trabalho e pelas conversas na bancada entre risadas e lágrimas;

Ao nosso técnico, **José Henrique Braga Fortes**, sempre disponível, atencioso e prestativo;

A todos os **colegas e amigos da Pós-Graduação**, em especial ao **Thiaguinho, Ariscu e Proust**, “fornecedores” de água milli-Q e companheiros de R.U. que me “aturaram” durante este período. Ao **Tiago**, pela ajuda nos experimentos desenvolvidos no LBBM. À **Karina** (LBBM) por ser muito prestativa;

Aos **professores do NUPEB** pelo convívio, conhecimento fornecido e pela receptividade em seus laboratórios permitindo a realização deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Carlos Chavez**, do Laboratório de Imuno-histoquímica de Proteínas da UFMG, pela colaboração na síntese dos peptídeos e, em especial, aos doutorandos **Ricardo e Cristina**;

Ao **Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso**, do Laboratório de Caracterização Molecular da UFOP, pela disponibilização do equipamento e auxílio nas análises, e a toda equipe, em especial ao **Júlio, Gustavo, Miriane e Aniel**;

À querida **Cida**, sempre sorridente e disposta a ajudar;

À minha prima **Karol**, pelos bons momentos em Ouro Preto fora da Universidade especialmente nos restaurantes durante o almoço;

À **Luisa**, menininha que cuidei em Ouro Preto, que me escutou, consolou e sorriu comigo diversas vezes;

Às minhas amigas **Dany, Fernanda e Letícia**, que mesmo distantes, acompanharam meu esforço e dedicação na realização desse curso. Além dessas, a todas as outras de quem sinto muito falta;

E, finalmente, agradeço à **Universidade Federal de Ouro Preto** e à histórica **Ouro Preto**, que ficará para sempre em minha memória!

## SUMÁRIO

Os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) são moléculas protéicas contendo dois domínios inibitórios distintos para enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina. O interesse por essa classe de inibidores decorre de estudos que mostram que o BBI possui efeito protetor no câncer induzido quimicamente e em leucoplasias humanas. Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que o inibidor obtido da semente de *Macrotyloma axillare* (BBIM) apresentou uma distribuição muito limitada ao interior dos vasos sanguíneos, com pequena distribuição para os tecidos. As propriedades farmacocinéticas do BBIM, como distribuição e absorção, podem ser melhoradas com a redução do tamanho deste inibidor, o que seria vantajoso do ponto de vista terapêutico. Embora os mecanismos de proteção do BBI contra o câncer permaneçam por serem elucidados, descobertas recentes indicam que o proteassoma é um importante alvo intracelular desse inibidor. Desta forma, este trabalho tem como objetivo a obtenção de formas menores do BBI: peptídeos sintéticos correspondentes aos domínios inibitórios da tripsina e quimotripsina e o BBI natural da semente de *M. axillare*, fragmentado. Os peptídeos sintéticos SCTKSIPPQCY e SCTFSLPPQCYGGGGG com atividades antitripsina e antiquimotripsina, respectivamente, foram sintetizados em fase sólida e identificados por LCMS-IT-TOF. Os fragmentos do inibidor da semente de *M. axillare* foram obtidos a partir da hidrólise com ácido fórmico a 2% em microondas por 30 min a 800 W. O estudo da absorção intestinal foi realizado em segmento de íleo isolado de camundongo pela medida da atividade inibitória que transpõe a luz intestinal. Os resultados mostraram que os peptídeos sintéticos, possivelmente, foram em grande parte degradados com perda da atividade, atingindo biodisponibilidade de apenas 5%. Por outro lado, enquanto o inibidor intacto apresentou 40% de absorção, os fragmentos atingiram valores de absorção próximos a 100 %. As formas nativas e menores dos inibidores foram também testadas em preparações de proteassoma de íleo de camundongo. Os resultados para a atividade quimotripsina-símile do proteassoma mostraram que todas as preparações do BBI inibiram essa atividade, com exceção da cabeça antitripsina do BBIM fragmentado. Em contraste, a atividade caspase-símile foi ativada pela cabeça antitripsina do BBIM fragmentado e pelo peptídeo sintético antiquimotripsina. Não foi encontrada diferença estatística para alterações na atividade

tripsina-símile do proteassoma ao se comparar as diferentes preparações de BBI. Concluímos com esse trabalho que os peptídeos sintéticos não representam uma boa alternativa para o aumento de biodisponibilidade, tendo em vista a instabilidade dos mesmos. Por outro lado, os fragmentos obtidos por hidrólise ácida do BBI mostraram biodisponibilidade 2.5 vezes maior do que aquela observada para o inibidor intacto. Finalmente, o perfil de atividade sobre o proteassoma mostrou um comportamento das formas reduzidas semelhante à molécula nativa, especialmente para a atividade quimotripsina-símile, sugerindo que essas preparações possam ter as mesmas propriedades antitumorais que a molécula íntegra, mas apresentando vantagens farmacocinéticas. Estudos posteriores visando determinar as atividades antitumorais dessas preparações e sobre a atividade endógena do proteassoma, auxiliarão na compreensão de mecanismos relacionados ao desenvolvimento do câncer.

**ABSTRACT**

Bowman-Birk Inhibitors (BBI) are protein molecules exhibiting two distinct inhibitory domains for proteases similar to trypsin and chymotrypsin. The interest for this class of inhibitors arose from studies showing a protective effect of BBI against chemically-induced cancers and human leukoplasias. Previous studies from our laboratory revealed that the inhibitor obtained from the seeds of *Macrotyloma axillare* (BBIM) displayed a quite limited distribution to the bloodstream and therefore with limited access to tissues. The pharmacokinetic properties of BBIM such as distribution and absorption can be improved by reducing the size of the inhibitor, which offers clear advantages in respect to its therapeutic applications. Although the mechanisms behind its anticancer properties are yet to be elucidated, recent findings indicate the proteasome as an important intracellular target of BBI. The present study aimed to obtain the following BBI derivatives of reduced size: synthetic peptides, corresponding to the inhibitory domains of trypsin and chymotrypsin, and fragmented versions of the native BBIM. The synthetic peptides SCTKSIPPQCY and SCTFSLPPQCYGGGGG, exhibiting anti-trypsin and anti-chymotrypsin activities respectively, were produced by the solid phase method and identified by LCMS-IT-TOF. The fragments derived from BBIM isolated from seeds were obtained by hydrolysis using 2% formic acid in a microwave for 30 min at 800W. Absorption of BBIM and its derivatives was evaluated by measuring the inhibitory activity that traverse the intestinal lumen using a segment of ileum isolated from mice. Our results indicated that the bioavailability for synthetic peptides was only 5%, possibly as a result of loss of activity due to degradation. In contrast, while the native BBIM reached 40% absorption, its fragments, obtained from acid hydrolysis, reached up to 100% bioavailability. Native and BBI derivatives were also tested for their ability to inhibit proteasome activities contained in a soluble preparation from ileum. With the exception of the anti-trypsin head, obtained from fragmented BBIM, all investigated derivatives inhibited the proteasome chymotrypsin-like activity. Contrarily, it was observed activation of the caspase-like activity by the anti-trypsin head and by the anti-chymotrypsin synthetic peptide. No statistically significant difference was observed for the trypsin-like activity in the presence of all investigated inhibitors. Our results allowed us to conclude that synthetic peptides do not represent a good alternative

to increase bioavailability of BBI derivatives, possibly due to their high instability. However, BBI fragments derived from acid hydrolysis revealed demonstrable pharmacokinetic advantages over both, the native molecule and synthetic peptides. At last, from our proteasome peptidase assays we concluded that the reduced forms of BBI do not compromise their ability to inhibit this complex, especially concerning its chymotrypsin-like activity. In light of this result, we hypothesize maintenance of anti-tumor properties of BBI derivatives compared to the native molecule. Further investigations will evaluate the anti-tumor activities of our inhibitors, using appropriate models, which may ultimately help in the elucidation of the mechanisms linked to cancer development.

## ÍNDICE

SUMÁRIO.....	VIII
ABSTRACT.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XIX
1. Introdução.....	2
1.1. Inibidores do tipo Bowman-Birk.....	2
1.2. Propriedades físico-químicas dos BBI.....	4
1.3. Mecanismo de ação dos BBI.....	4
1.4. Aspectos farmacocinéticos dos BBI.....	6
1.5. Peptídeos sintéticos dotados de atividade inibitória.....	7
1.6. Fragmentação dos BBI.....	10
1.6.1 Clivagem química de proteínas utilizando ácido fórmico.....	11
1.6.2. Digestão enzimática assistida por microondas.....	13
1.7. O Proteassoma.....	14
1.7.1. O Proteassoma – Estrutura e funções.....	14
1.7.2. Interação dos BBI com o Proteassoma.....	19
1.8. A leguminosa <i>Macrotyloma axillare</i> .....	20
1.8.1. Classificação Sistemática da <i>Macrotyloma axillare</i> .....	21
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivos gerais.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. Materiais e métodos.....	27
3.1. Síntese peptídica.....	27
3.1.1. Ativação da resina.....	27
3.1.2. Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados.....	28
3.1.3. Clivagem do peptídeo.....	29
3.1.4. Ciclização do peptídeo.....	29
3.1.5. Purificação e Caracterização dos Peptídeos Sintéticos.....	30
3.1.5.1. Purificação dos peptídeos sintéticos antitripsina e antiqumotripsina.....	30
3.1.5.2. Identificação dos peptídeos sintéticos por espectrometria de massa... ..	30

---

3.2 Atividades Inibitórias.....	31
3.2.1. Tripsina Bovina .....	31
3.2.2. Quimotripsina Bovina .....	31
3.3. Fragmentação do Inibidor Bowman-Birk obtido da semente de <i>Macrotyloma axillare</i> (BBIM) .....	32
3.3.1. Identificação dos fragmentos por espectrometria de massa .....	33
3.3.2. Análise de fragmentação do BBIM através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% .....	34
3.3.3. Separação das cabeças inibitórias obtidas por fragmentação do BBIM utilizando o Filtro <i>Amicon Ultra-4 3000 Da</i> .....	35
3.4. Ensaio de absorção <i>in vitro</i> do BBIM, BBIM fragmentado e peptídeos sintéticos em fêlo isolado de camundongos BALB/c .....	36
3.4.1 Recuperação da atividade inibitória dos peptídeos sintéticos antitripsina e antiquimotripsina em homogenato de fêlo isolado.....	399
3.5. Construção da tabela comparativa das atividades específicas e IC <sub>50</sub> das diferentes formas do BBIM .....	41
3.6. Influência das diferentes formas de inibidores sobre a atividade do proteassoma.....	41
3.6.1. Obtenção do extrato citosólico de segmento de fêlo de camundongos BALB/c .....	41
3.6.2. SDS – PAGE .....	42
3.6.3. Avaliação das atividades peptidásicas do proteassoma na presença de inibidores derivados do BBI.....	42
4. Resultados e discussão.....	45
4.1. Síntese peptídica .....	45
4.1.1. Síntese e análise do peptídeo sintético antitripsina .....	45
4.1.2. Síntese e análise do peptídeo sintético antiquimotripsina.....	47
4.1.3. Absorção intestinal em segmento isolado de fêlo .....	49
4.2. Fragmentação do BBI obtido da semente de <i>Macrotyloma axillare</i> .....	53
4.2.1 Absorção intestinal dos fragmentos obtidos por hidrólise ácida em segmento de fêlo isolado.....	60
4.3. Influência das diferentes formas de inibidores sobre a atividade do proteassoma.....	62
5. Conclusões .....	68
6. Perspectivas .....	70
7. Referências Bibliográficas .....	72

**LISTA DE ABREVIATURAS**

%	Porcentagem
μL	Microlitros
ACN	Acetonitrila
AQ	Atividade antiqumotripsina
AT	Atividade antitripsina
BBI	Inibidores do tipo <i>Bowman-Birk</i>
BBIM	Inibidor <i>Bowman-Birk</i> obtido da semente de <i>Macrotyloma axillare</i>
BCA	Ácido bicinchonínico
cm	Centímetros
ConA	Lectina da concanavalina A
DCM	Diclorometano
DIPC	Diisopropilcabodiimida
DL-BApNA	<i>N</i> -α-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico)
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
ES-MS	<i>Electrospray – Mass Spectrometry</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
Glu-C	Endoproteinase Glu-C
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
Ki	Constante de inibição
L-BTpNA	<i>N</i> -α-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida
Lys-C	Endoproteinase Lys-C

mA	miliAmper
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
mg	miligramas
MM	Massa Molecular
Ms	Milisegundo
NEM	N-etilmaleimida
pI	Ponto isoeletrico
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TLCK	Tosil-L-lisina clorometilcetona
TPCK	Tosil-L-fenilalanina clorometilcetona
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
V	Volts
UV	Ultravioleta
W	Watts

<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Símbolo</b>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 01:** Estrutura do BBI da soja, como determinado por Odani e Ikeneka (1973). .. 3

**Figura 02:** Mecanismo do transporte paracelular. .... 7

**Figura 03:** Estrutura do Inibidor Bowman-Birk. .... 8

**Figura 04:** Mecanismo da clivagem com ácido fórmico. .... 12

**Figura 05:** Estrutura do proteassoma 20S. .... 16

**Figura 06:** A leguminosa *Macrotyloma axillare*. .... 20

**Figura 07:** Ilustração esquemática da *Macrotyloma axillare*. .... 22

**Figura 08:** Microondas adaptado para a fragmentação do BBIM com ácido fórmico. . 33

**Figura 09:** Análise cromatográfica em fase reversa do peptídeo antitripsina SCTKSIPPQCY. .... 46

**Figura 10:** Identificação do peptídeo antitripsina SCTKSIPPQCY (pico A, figura A) por espectrometria de massa em LCMS IT-TOF do tipo *electrospray* ..... 46

**Figura 11:** Análise cromatográfica em fase reversa do peptídeo antitripsina purificado em coluna de *Q-sepharose*. .... 47

**Figura 12:** Análise cromatográfica em fase reversa do peptídeo antiqumotripsina SCTFSLPPQCYGGGGG. .... 48

**Figura 13:** Identificação do peptídeo antiqumotripsina SCTFSLPPQCYGGGGG (pico principal da figura D) por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*. .... 48

**Figura 14:** Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c. .... 50

**Figura 15:** Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM e peptídeo sintético antitripsina, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c. .... 51

**Figura 16:** Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM e peptídeo sintético antiqumotripsina, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c. .... 51

**Figura 17:** Seqüência primária das isoformas DE-3 e DE-4 segundo Joubert *et al.* (1979) e representação dos fragmentos gerados pela hidrólise com ácido fórmico. .... 55

**Figura 18:** Percentagem de atividade inibitória do BBIM após fragmentação com ácido fórmico 2% no microondas em diferentes intervalos de tempo. .... 56

<b>Figura 19:</b> Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 15% SDS-PAGE do BBIM e do BBIM fragmentado (BBIMF).....	58
<b>Figura 20:</b> Separação das cabeças obtidas do BBIM a partir da utilização do filtro <i>Amicon Ultra-4 3000 Da</i> . ....	59
<b>Figura 21:</b> Ensaio de absorção <i>in vitro</i> do BBIM, peptídeo sintético antitripsina e BBIM fragmentado, em função do tempo, em fêos isolados de camundongos BALB/c. ....	61
<b>Figura 22:</b> Ensaio de absorção <i>in vitro</i> do BBIM, peptídeo sintético antiquimotripsina e BBIM fragmentado, em função do tempo, em fêos isolados de camundongos BALB/c. ....	61
<b>Figura 23:</b> Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12 % SDS-PAGE das três preparações de fêo ( 1, 2 e 3) de camundongos utilizadas nos ensaios de atividades peptidásicas do proteassoma. ....	62
<b>Figura 24:</b> Atividade quimotripsina-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato citosólico de fêo de camundongos BALB/c.....	63
<b>Figura 25:</b> Atividade tripsina-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato citosolico de fêo de camundongos BALB/c.....	64
<b>Figura 26:</b> Atividade caspase-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato citosolico de fêo de camundongos BALB/c.....	65

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Intervalos de tempo associados à determinação da atividade das diferentes formas de inibidores durante absorção *in vitro*.

**Tabela 2:** Identificação por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray* dos fragmentos obtidos pela hidrólise ácida do BBIM no microondas por 30 minutos.

**Tabela 3:** Comparação das atividades específicas e IC<sub>50</sub> das diferentes formas do inibidor BBIM.

## *1. Introdução*

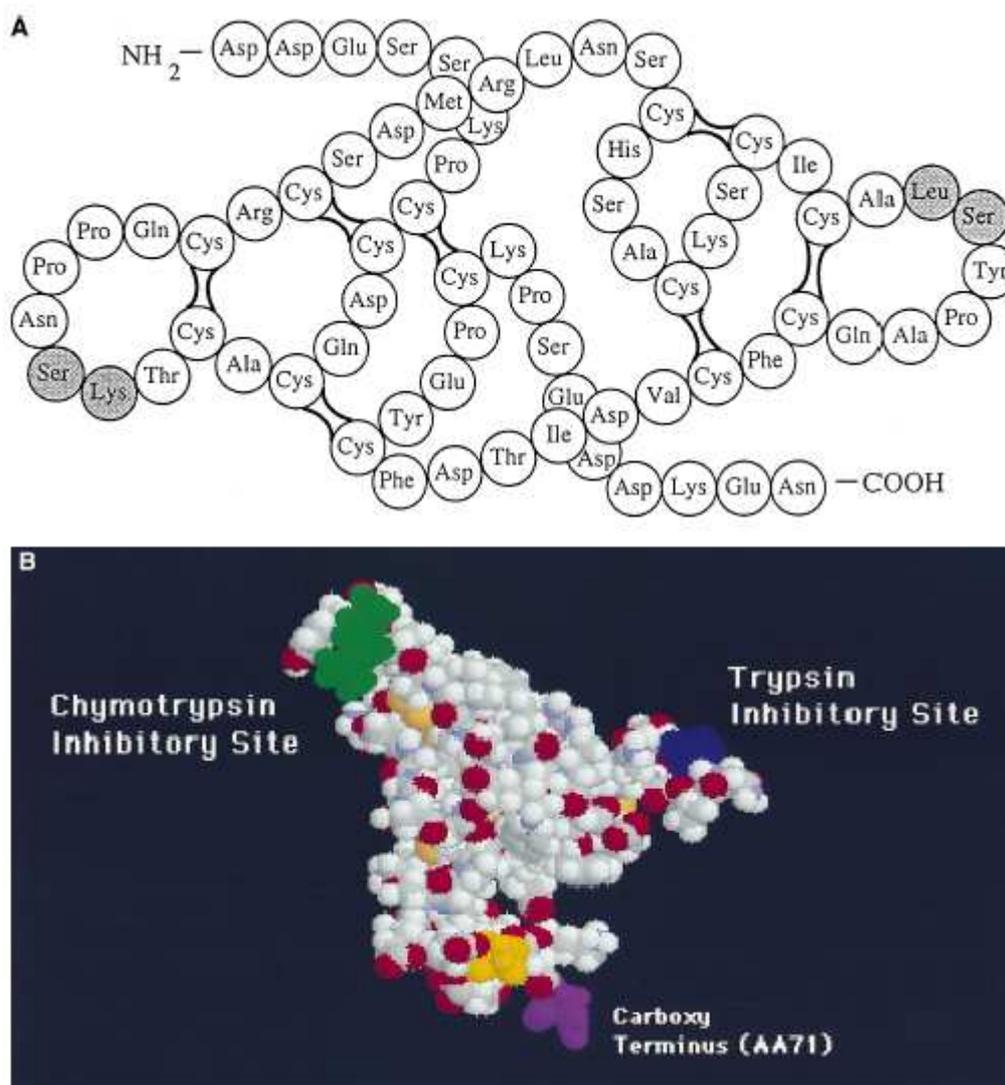
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Inibidores do tipo Bowman-Birk

Os inibidores do tipo *Bowman-Birk*, comumente chamados de BBI, são inibidores protéicos citoplasmáticos de serino-proteases. Os BBI foram isolados pela primeira vez em sementes de soja por *Bowman*, em 1946, e caracterizados por *Birk*, em 1961, sendo posteriormente identificados em outras leguminosas (Norioka *et al.*, 1982; Norioka & Ikenaka, 1983); e gramíneas (Odani *et al.*, 1986).

Os BBI são proteínas de baixa massa molecular, aproximadamente 8 kDa, apresentam estrutura em cadeia única (figura 1A), rica em resíduos de cisteína que lhes confere uma estrutura rígida e bastante conservada nas diferentes espécies do reino vegetal, (Morhy & Ventura, 1987) do qual são exclusivas. As principais enzimas inibidas por BBI são tripsina e quimotripsina, uma vez que sua estrutura possui dois *loops* ou duas “cabeças de inibição”, sendo uma para a tripsina e outra para a quimotripsina (figura 1B), usualmente consistindo de nove resíduos de aminoácidos cada cabeça (Prakash *et al.*, 1996). Além dessas enzimas, os BBI podem inibir ainda a catepsina G, a elastase (Larionova *et al.*, 1993) e a quimase (Ware *et al.*, 1997). Estudos cristalográficos mostraram que a estrutura tridimensional dessa proteína é estabilizada principalmente pelas pontes dissulfeto, com uma pequena contribuição do núcleo hidrofóbico da molécula (Chen *et al.*, 1992).

As sementes utilizam os inibidores de proteases como reserva de aminoácidos sulfurados, como reguladores de proteases endógenas e como mecanismo de defesa contra insetos, predadores e infecções bacterianas e virais (Ryan, 1990). O BBI da semente da soja é o representante clássico desta família de inibidores e vem sendo extensivamente estudado, enquanto que BBI de outras sementes de monocotiledôneas e dicotiledôneas estão sendo gradativamente identificados e caracterizados (Losso, 2008). BBI de dicotiledôneas usualmente possuem massa molecular de 7-8 kDa e são inibidores de serino-proteases de “dupla-cabeça”, enquanto aqueles das sementes de monocotiledôneas são mais variáveis no tamanho e nos sítios inibitórios (Ragg, 2006). Ao nível estrutural, molecular e de outras propriedades químicas e físicas, o BBI deste



**Figura 01: Estrutura do BBI da soja, como determinado por Odani e Ikeneka (1973).** A - Em tom de cinza, do lado direito, o sítio inibitório para a quimotripsina (Leu – Ser), e do lado esquerdo o sítio inibitório para a tripsina (Lys – Ser). B - Estrutura tridimensional do BBI em solução. O BBI da soja é uma proteína de 71 aminoácidos (AA). A região carboxi-terminal da proteína é representada em roxo (AA71), e a região N-terminal é representada em amarelo pelo AA1. O sítio inibitório para a quimotripsina, AA43-44 é representado em verde e o sítio inibitório para tripsina é representado em azul, AA16-17. Adaptado de *Kennedy, A. R, Pharmacology & Therapeutics*, 78:3:167-209,1998.

estudo, purificado da semente da *Macrotyloma axillare*, denominados DE-3 e DE-4, se assemelham bastante ao BBI da soja, apresentando uma seqüência de aminoácidos com elevado grau de homologia, incluindo os 14 resíduos de cisteína conservados (Joubert *et al.*, 1979).

O interesse por essa classe de inibidores de proteases é principalmente baseado nas descobertas de que o BBI pode atuar como agente preventivo do câncer em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. Os BBIs também mostraram atividade anti-inflamatória pela inibição de proteases envolvidas no processo inflamatório (Kennedy, 1998). No entanto, as bases moleculares dessas atividades dos BBI ainda não foram totalmente esclarecidas.

## 1.2. Propriedades físico-químicas dos BBI

Os BBI são moléculas muito resistentes ao calor, força iônica e pH, sendo solúveis entre o pH 1,5 e 12 (Weder, 1986). Esses inibidores são caracterizados como moléculas pequenas (76 resíduos de aminoácidos para o BBI purificado da semente de *Macrotyloma axillare*) contendo sete pontes dissulfeto (Joubert *et al.*, 1979) e ligações de hidrogênio que permitem uma estrutura muito estável, garantindo suas atividades mesmo em condições desfavoráveis como temperaturas elevadas e pHs drásticos.

Estudos da resistência de inibidores de protease presentes em leguminosas frente a diferentes valores de pH são alvos de várias investigações. Foi observado por Obara & Watanabe (1971) que os inibidores de tripsina purificados da soja foram termicamente estáveis quando aquecidos em pH ácido e menos estáveis em pH alcalino. Osman *et al.*, 2002 mostraram que o BBI purificado da soja foi termicamente estável após incubação por 360 minutos em pH neutro e por 120 minutos em pH ácido (pH 3,0), ambos a 100°C; e que a incubação por apenas 40 minutos em pH básico levou à inativação do inibidor. Essa maior perda de atividade inibitória em meio alcalino é provavelmente devido à destruição das ligações dissulfeto que são responsáveis por manter a estrutura do inibidor intacta (Friedman *et al.*, 1984).

## 1.3. Mecanismo de ação dos BBI

As serino-proteases são assim denominadas por possuírem um mecanismo catalítico comum que envolve um resíduo de serina particularmente reativo (Ser-195) no sítio ativo (Voet *et al.*, 2000). As principais serino-proteases compreendem a tripsina, quimotripsina e a elastase. Todas essas proteases catalisam a hidrólise das ligações peptídicas, mas com diferentes especificidades pelas cadeias laterais que

compreendem a ligação peptídica a ser clivada. Na convenção descrita por Schechter & Berger (1967), o resíduo P1 corresponde ao sítio de especificidade, sendo que os resíduos de aminoácidos em direção ao N-terminal da ligação a ser hidrolisada (P1-P1'), são denominados ...P3-P2-P1, enquanto aqueles em direção ao C-terminal são P1'-P2'-P3'... A tripsina cliva preferencialmente substratos contendo resíduos positivos como arginina ou lisina no sítio P1, a quimotripsina hidrolisa preferencialmente substratos contendo leucina, fenilalanina e tirosina, enquanto que a elastase hidrolisa preferencialmente substratos contendo alanina (Losso, 2008).

Os inibidores de serino-proteases reagem com o sítio ativo (Ser-195) da protease, formando derivativos de enzimas inativadas. Os inibidores clássicos dessa classe são os inibidores do tipo *Kunitz*, inibidores do tipo *Bowman-Birk*, inibidores da batata do tipo I e II e os inibidores do tipo *Kazal* (Losso, 2008).

A interação do BBI com a tripsina ou com a quimotripsina é capaz de inibir eficientemente a atividade dessas serino-proteases. A conformação do *loop* do sítio reativo do BBI é complementar ao sítio ativo da proteína a ser inibida, permitindo uma ligação firme do inibidor à protease (Chen *et al.*, 1992). Essa ligação do tipo reversível ocorre com elevada afinidade, semelhante à afinidade pelos substratos protéicos. O encaixe adequado nos sítios enzimáticos impedem as mudanças conformacionais necessárias à catálise, gerando um complexo típico enzima-inibidor com uma barreira energética desfavorável à hidrólise (R.Read, 1986). Estudos mostram que as duas enzimas (tripsina e quimotripsina) podem ser simultaneamente inibidas pelo BBI em sua forma monomérica. Acredita-se que ocorra uma pequena mudança conformacional no inibidor com o objetivo de acomodar as duas enzimas, havendo então um comportamento cooperativo nessas ligações (Prakash *et al.*, 1997). Além disso, Jensen *et al.* (1996) afirmam que após a formação do complexo, o BBI é clivado muito lentamente.

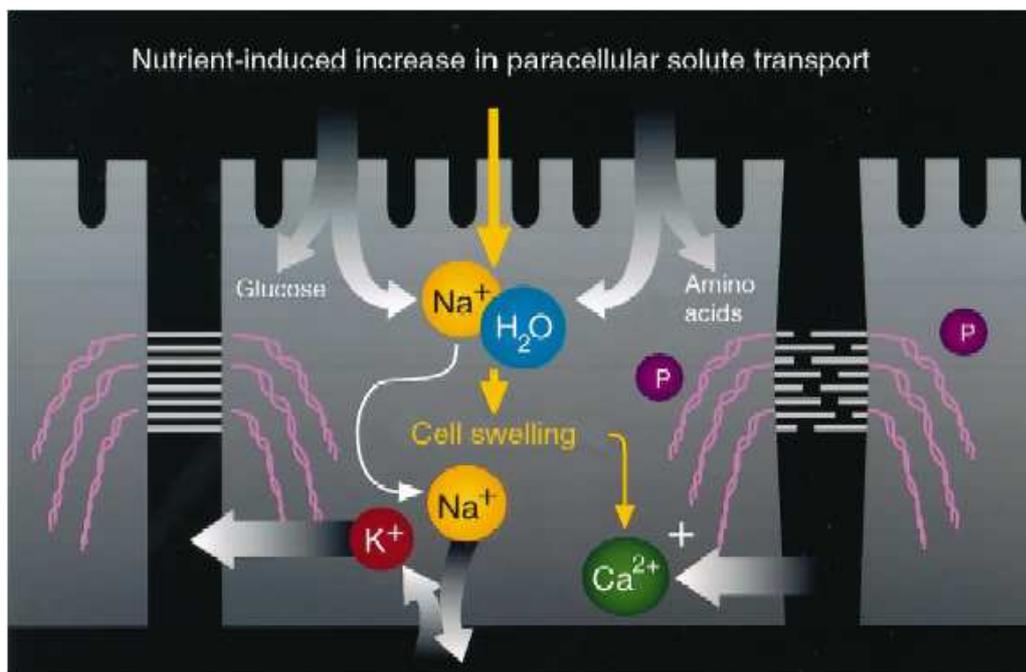
Segundo Joubert *et al.* (1979), o sítio inibitório do BBIM para a tripsina compreende Lys<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup> para a isoforma DE-3 e DE-4 quando estão alinhados pela primeira cisteína e numerados a partir da mesma; enquanto que para a quimotripsina, Phe<sup>36</sup>-Ser<sup>37</sup> para DE-3 e Leu<sup>36</sup>-Ser<sup>37</sup> para DE-4 quando estão alinhados nas mesmas condições.

#### 1.4. Aspectos farmacocinéticos do BBI

Estudos têm reportado que os inibidores de protease são efetivos em reverter o processo carcinogênico *in vivo* e *in vitro* induzido quimicamente e pela radiação com raios X (Harrison *et al.*, 1985; Yavelow *et al.*, 1985; Evans *et al.*, 1992). A distribuição do BBI da soja, após administração oral, foi estudada com o inibidor marcado com  $^{125}\text{I}$  em camundongos por Billings *et al.* (1992). Observou-se níveis mais elevados de radioatividade no conteúdo luminal obtido do estômago, intestino delgado e cólon, além de uma distribuição pequena, mas difusa por todo organismo e quantidades significativas na urina e fezes.

Com relação ao mecanismo de absorção do BBI, não foram detectados receptores para o inibidor na superfície de células mamárias, sugerindo que este não é capturado por pinocitose mediada por receptores (Billings *et al.*, 1991). Estudos mostraram que o transporte do inibidor através do lúmen intestinal é um processo passivo, indicando que o BBI atravessa o lúmen intestinal por um mecanismo paracelular, ao invés da via de transporte transcelular (Billings *et al.*, 1992).

Em geral, a glicose e aminoácidos, como o triptofano, são absorvidos do lúmen intestinal via transportadores acoplados ao sódio. No entanto, as macromoléculas não são facilmente absorvidas pela via transcelular, podendo ser absorvidas pela via paracelular. Quando esses transportadores estão funcionando na sua capacidade máxima, como após a ingestão de alimentos, uma grande quantidade de sódio penetra no citosol e ocorre um conseqüente influxo de água. Em seguida surgem eventos celulares em resposta à penetração de sódio e água, como o efluxo de sódio pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, e entrada de cálcio. Em resposta aos níveis aumentados de cálcio no citosol, a quinase de cadeia leve da miosina é ativada, resultando na contração do anel apical de actina. Essa contração pode levar a uma leve abertura do espaço paracelular provocada pela tensão no citoesqueleto associado as zonas de oclusão (*tight-junctions*), com conseqüente aumento da absorção de moléculas maiores (Daugherty & Mrsny, 1999). O mecanismo de transporte paracelular encontra-se ilustrado na figura 2.



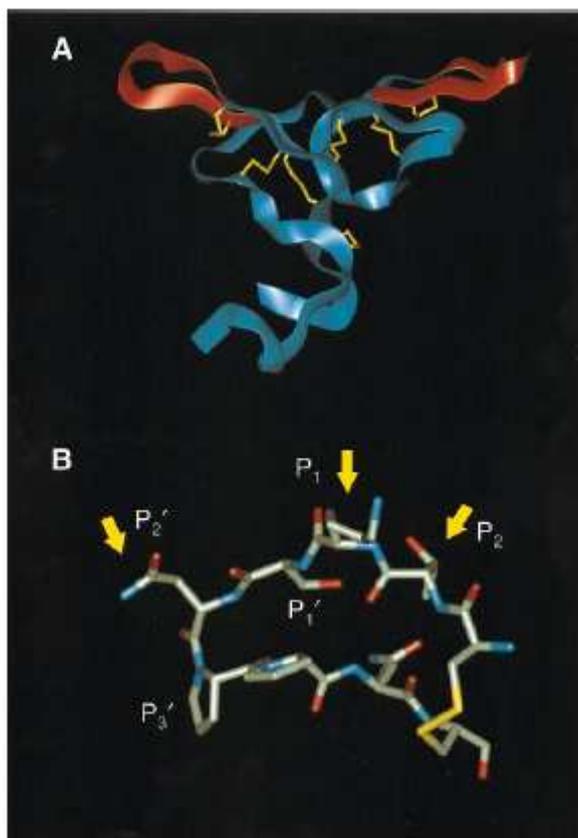
**Figura 02: Mecanismo do transporte paracelular.** A figura ilustra o aumento do influxo de nutrientes nas células intestinais pela via paracelular. Adaptado de *Daugherty & Mrsny, PSTT, 2:7:281-287,1999.*

### 1.5. Peptídeos sintéticos dotados de atividade inibitória

A maioria dos processos bioquímicos depende do reconhecimento molecular específico entre peptídeos ou proteínas e outras moléculas biologicamente ativas. Os importantes papéis das proteases na regulação biológica fazem dessas moléculas alvos para intervenções terapêuticas, existindo então o interesse na identificação de novos inibidores. A questão chave no desenvolvimento desses inibidores para fins terapêuticos é planejar inibidores sintéticos com qualidades voltadas para farmacologia em todos os seus aspectos.

Inibidores da família Bowman-Birk possuem uma rede conservada de pontes dissulfeto que auxiliam na formação de uma estrutura simétrica com dois domínios, cada um contendo um sítio de ligação independente para a enzima (figura 3) (Chen *et al.*, 1992). O *loop* de ligação está contido dentro de uma região nonapeptídica ligado via ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína. A seqüência do sítio de ligação determina a especificidade da inibição, que frequentemente espelha a especificidade das proteases

por seus substratos. Segundo Schechter & Berger (1967), é o resíduo P1 do sítio reativo que confere a especificidade inibitória.



**Figura 03: Estrutura do Inibidor Bowman-Birk.** A - A estrutura do Inibidor Bowman-Birk é mostrada em um modelo de fitas. Os dois sítios de inibição estão em vermelho e as cadeias laterais dos resíduos de cisteína estão em amarelo. B - Detalhes da estrutura tridimensional do *loop* de ligação antiqumotripsina do BBI. Adaptado de *McBride et al., J. Mol. Biol, 259:819-827, 1996.*

Com o intuito de identificar o papel de resíduos de aminoácidos específicos no processo inibitório, vários peptídeos sintéticos consistindo de um único domínio de inibição têm sido produzidos (McBride *et al.*, 2002). Nishino *et al.* (1977) foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem que um peptídeo monocíclico composto por nove resíduos baseado no domínio de ligação à tripsina foi suficiente para preservar as propriedades inibitórias do inibidor nativo. Maeder *et al.* (1992) desenvolveram um peptídeo monocíclico composto por 11 resíduos baseado na sequência de nove resíduos localizados na região do *loop* antitripsina do Inibidor Bowman-Birk , isoforma DE-4 da

semente de *Macrotyloma axillare*. Esse peptídeo apresentou uma constante de inibição menor para a tripsina e uma melhor resistência à proteólise.

McBride *et al.* (1996), criaram uma biblioteca combinatorial de peptídeos cíclicos imobilizados utilizando 11 resíduos de aminoácidos como seqüência modelo (Maeder *et al.*, 1992) para identificar inibidores ativos anti-quimotripsina, com variações randômicas nas posições P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>'. Em P<sub>2</sub> foi encontrado exclusivamente o aminoácido treonina; no sítio P<sub>1</sub>, fenilalanina e tirosina; e leucina, isoleucina e norleucina foram encontrados em P<sub>2</sub>'. A identificação dos resíduos aromáticos no sítio P<sub>1</sub> é consistente com os substratos da quimotripsina (Schellenberger *et al.*, 1991). A conservação do resíduo de treonina em P<sub>2</sub> pode ser explicada por Lin *et al.* (1993), em que uma estrutura cristalizada do inibidor do feijão-mungo-verde complexado com tripsina mostrou que o resíduo de treonina em P<sub>2</sub> realiza ligações de hidrogênio dentro do *loop* inibitório e ainda contatos hidrofóbicos com a His57 dentro da tríade catalítica. É provável que essas interações sejam importantes para todas as serino-proteases, podendo explicar a conservação desse resíduo. Já para os resíduos de aminoácidos identificados no sítio P<sub>2</sub>', que são isômeros uns dos outros, é sugerida uma preferência por substituintes alifáticos nessa localização. As constantes de inibição dos peptídeos sintéticos foram determinadas, encontrando potentes inibidores anti-quimotripsina para todas as seqüências, com valores de K<sub>i</sub> em torno de 20 nM. Os valores de K<sub>i</sub> encontrados para esses peptídeos representam os mais baixos valores já relatados para seqüências baseadas no sítio reativo do BBI quando se inibe a quimotripsina.

Com o objetivo de identificar com clareza a importância do resíduo treonina no sítio P<sub>2</sub>, McBride *et al.* (1998), realizaram uma análise sistemática compreendendo 26 variações nessa posição, utilizando a mesma seqüência peptídica de McBride *et al.* (1996). Esse estudo pôde confirmar que a treonina apresentou o menor valor de K<sub>i</sub> e a menor taxa de hidrólise. Avaliações a partir de informações estruturais disponíveis mostraram que foram realizadas interações tanto com o grupo metil, como com o grupo hidroxila da treonina, sendo esse o motivo pelo qual nenhum outro resíduo é tão efetivo nessa localização.

Gariani *et al.* (1999) estudaram os efeitos na variação dos resíduos de aminoácidos em P<sub>2</sub>', a partir da comparação de 21 peptídeos sintéticos inibidores de tripsina. Variações no resíduo P<sub>2</sub>' resultaram em uma amplo efeito nos valores de K<sub>i</sub>

dos peptídeos sintéticos, variando de 9 nM a 1 mM. Aminoácidos com cadeias laterais alifáticas resultaram nos melhores inibidores, com valores de  $K_i$  bem baixos, obtendo o menor valor com o aminoácido isoleucina. Resíduos carregados positivamente, como arginina e lisina, foram tolerados em  $P_2'$ , apresentando valores de  $K_i$  relativamente baixos. Entretanto, os aminoácidos com cadeias laterais negativas geraram inibidores fracos, como por exemplo, o glutamato que não gerou atividade inibitória, apresentando um valor de  $K_i$  superior a ordem de 1 mM. Dois outros peptídeos também não geraram atividade inibitória mensurável: glicina e prolina. Os resíduos encontrados com maior frequência no sítio  $P_2'$  em BBIs de plantas dicotiledôneas são isoleucina e metionina, estando presente em 78 dos 121 *loops* inibitórios de 61 espécies diferentes de dicotiledôneas (Fernandez *et al.*, 2007).

Um trabalho recente de biologia computacional propõe novas estruturas para se obter interações mais fortes do BBI com tripsina e quimotripsina (Fernandez *et al.*, 2007).

## 1.6. Fragmentação do BBI

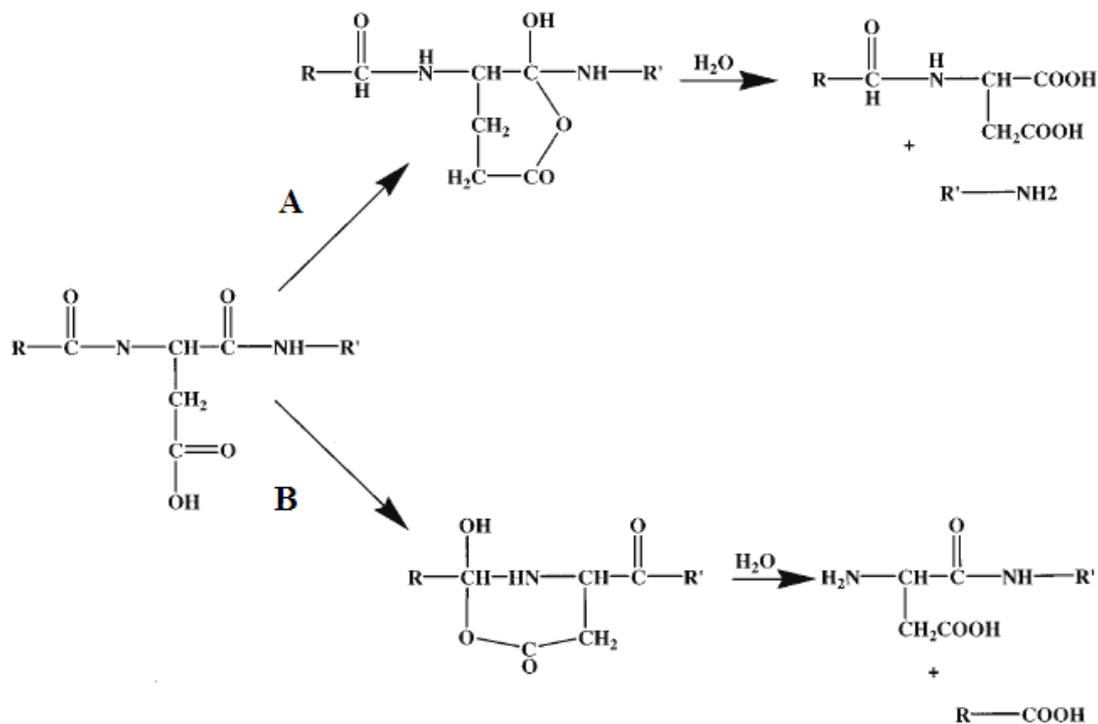
Peptídeos bioativos podem influenciar diretamente numerosos processos biológicos produzindo efeitos gastrointestinais, hormonais, imunológicos, neurológicos e/ou nutricionais. A proteólise enzimática *in vivo* e *in vitro* da caseína, por exemplo, gerou alguns peptídeos bioativos com atividades antioxidantes e imuno-modulatórias (Phelan *et al.*, 2009).

O interesse na obtenção de fragmentos do BBI da *Mcrotyloma biflorus* foi descrito por Sreerama & Gowda (1997) com o objetivo de identificar porções antigênicas na proteína. A digestão do inibidor foi realizada com TPCK-tripsina, brometo cianogênico (CNBr) e lisilendoproteinase C (Lys-C) com baixo rendimento e sem a preocupação na obtenção de produtos ativos.

### 1.6.1 Clivagem química de proteínas utilizando ácido fórmico

Recentemente, várias alternativas vêm sendo descritas para a clivagem eficiente de proteínas para análises proteômicas. A tripsina é a protease mais comumente utilizada para digestão enzimática, pois ela apresenta uma especificidade bem definida nos resíduos de lisina e arginina, que geralmente produzem fragmentos peptídicos de tamanho apropriado para análises por espectrometria de massa (Li *et al.*, 2001). Existem também outras proteases disponíveis comercialmente como Lys-C e Glu-C que são menos utilizadas. Um método desenvolvido por Bark *et al.* (2001) empregando termolisina em altas temperaturas, permitiu aumentar a flexibilidade da estrutura protéica resultando em maior rendimento proteolítico. Entretanto, a falta de especificidade da termolisina é considerada um fator problemático para as identificações dos peptídeos gerados.

O princípio da clivagem química no aminoácido ácido aspártico, utilizando ácido fórmico diluído foi primeiramente descrito por Schultz (1967), e somente otimizado por Inglis (1983). Considerando as reações químicas envolvidas nesse princípio, pode-se dizer que as ligações peptídicas envolvendo o resíduo ácido aspártico são clivadas preferencialmente em condições de pH suficientes para manter o grupo  $\beta$ -carboxílico não dissociado. O mecanismo para hidrólise nesse resíduo propõe a formação de um anidrido ou um intermediário imida cíclico entre o grupo  $\beta$ -carboxila e o grupo amida, tanto no *N* como no *C*- terminal, através da eliminação de uma molécula de água (figura 4). Apesar das ligações Asp-X serem mais facilmente clivadas, as X-Asp também podem ser clivadas em menor escala. Por essa razão, os peptídeos resultantes, na maioria dos casos conservam pelo menos um resíduo aspartato no ponto de clivagem, mas também podem perder esse resíduo por um evento de dupla clivagem. Tanto o HCl como o ácido fórmico podem ser utilizados para manter o pH do meio correto (Li *et al.*, 2001). Segundo Inglis (1983), a incubação de amostras protéicas em solução de ácido fórmico 2% em pH 2,0 a 108°C por 2 horas é a condição ótima para a hidrólise de proteínas em solução.



**Figura 04: Mecanismo da clivagem com ácido fórmico.** A – Clivagem em Asp-X. B – Clivagem em X-Asp. Adaptado de *Li et al., Anal. Chem. 73:5395 – 5402, 2001*.

Um método alternativo de digestão baseado na clivagem química utilizando ácido fórmico em gel de poliacrilamida, usado para identificação protéica por espectrometria de massa, foi testado por *Li et al.* (2001). Os resultados mostraram que o método foi aplicável, sendo rápido, claro e específico, proporcionando uma identificação protéica tão confiável quanto a da digestão trípica. No processo, nenhum tampão foi adicionado à digestão, eliminando os ruídos químicos e a reação efetuada em uma única etapa reduziu a manipulação da amostra, diminuindo perdas e evitando contaminações. É importante ressaltar que já que a maioria das proteínas pode ser dissolvida em ácido fórmico, esse método de clivagem oferece uma boa alternativa para a digestão de proteínas insolúveis. Como os resíduos aspartato são mais comuns em relação a outros resíduos, eles oferecem a vantagem de uma ampla diversidade de substratos. A não toxicidade do ácido fórmico também pode ser considerada como um fator positivo para esse método de digestão em comparação com a digestão por brometo cianogênico, que além de tóxico, hidrolisa somente nos resíduos de metionina, que são mais raros em seqüências protéicas.

### 1.6.2. Digestão enzimática assistida por microondas

A irradiação pelas microondas foi identificada em meados dos anos 80 como sendo um tipo de calor eficiente para reações químicas, onde reações que requerem muitas horas sobre condições convencionais podem ser concluídas frequentemente em poucos minutos, com seletividade e rendimento elevado (Larhed & Hallberg, 2001). O microondas tem sido empregado nas áreas de produtos naturais, heterocíclicos, peptídeos, reações catalíticas e componentes medicinais com o intuito de melhorar os processos químicos (Pramanik *et al.*, 2002).

As microondas são radiações não-ionizantes que interagem na fase líquida com pares de íons e moléculas orgânicas que estão no estado dipolo, como amidas, ésteres e água. A energia das microondas é diretamente transferida para essas espécies e o perfil energético é diferente do que está envolvido no calor convencional de transmissão / convecção. Entretanto, ambas as condições de reações enzimáticas produzem resultados comparáveis, quando analisado por espectrometria de massa, como MALDI e ES-MS (Pramanik *et al.*, 2002). A tecnologia das microondas, empregada frequentemente em sistema de microondas específico para pesquisas, pode ser empregada também em sistema doméstico. Os pesquisadores encontraram 100% de digestão para o citocromo C com 13 minutos de irradiação utilizando microondas doméstico (Lin *et al.*, 2005).

Um estudo realizado por Pramanik *et al.* (2002), avaliou a tecnologia das microondas na digestão enzimática de proteínas. O primeiro teste realizado pelos pesquisadores consistiu em testar a digestão com tripsina do citocromo C bovino, uma proteína globular relativamente resistente à clivagem enzimática sobre condições não desnaturantes. Utilizou-se o método clássico de digestão, o qual consiste em manter a mistura de digestão a 37°C por seis horas, e sob as microondas por 10 minutos, encontrando resultados similares de espectrometria de massa para ambos os métodos. Outra proteína testada foi a ubiquitina bovina, uma proteína firmemente enovelada sendo extremamente resistente à desnaturação. A estabilidade dessa proteína tem sido atribuída ao núcleo pronunciadamente hidrofóbico e devido ao fato de aproximadamente 90% dos resíduos da cadeia polipeptídica estarem envolvidos em ligações de hidrogênio intramoleculares. Nesse caso, testou-se novamente a digestão

com 10 minutos de irradiação microondas, mas aumentou para 24 horas o tempo de incubação para o método clássico, encontrando novamente resultados similares para os experimentos. Além disso, os autores realizaram a digestão no microondas em diversos intervalos de tempo (10, 30 e 60 minutos), observou-se pequenos benefícios para 30 e 60 minutos, sugerindo que longos tempos de irradiação degradam a enzima digestora. Os autores testaram ainda outras proteínas e outras condições, podendo afirmar que a irradiação pelas microondas reduz o processo de digestão a minutos. O processo de digestão enzimática de proteínas assistido por microondas pode ser realizado também com solventes orgânicos. Sob a influência de um rápido aquecimento pelas microondas, as reações enzimáticas podem ocorrer mesmo na presença de solventes como clorofórmio, o que não acontece no caso de uma digestão tradicional, pois a enzima torna-se inativa (Lin *et al.*, 2005).

Hua *et al.* (2006) desenvolveram uma nova metodologia para a digestão de proteínas assistida por microondas utilizando solução de ácido fórmico 2%. Os resultados mostraram que irradiar a amostra por 10 minutos em solução de ácido fórmico 2% foi suficiente para uma reação de clivagem com total especificidade nos resíduos aspartato. Para o controle, onde nenhuma irradiação foi aplicada, somente dois peptídeos foram observados por MALDI após oito horas de incubação em temperatura ambiente. Tal metodologia também se mostrou competente para digestão em gel de bandas de proteínas obtidas por SDS-PAGE.

Essa nova metodologia oferece eficiência, confiabilidade e simplicidade para a identificação protéica, além de acelerar o processo de digestão a minutos ao invés de horas em comparação com o método enzimático tradicional. Além disso, essa técnica minimiza a manipulação e a introdução de outros ruídos químicos.

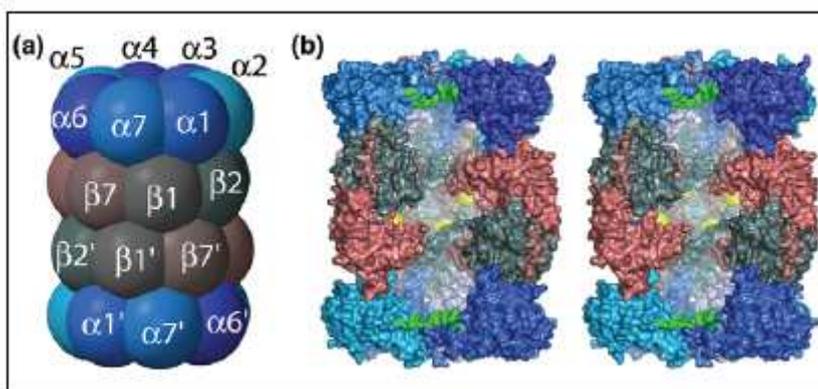
## **1.7. O Proteassoma**

### **1.7.1. O Proteassoma – Estrutura e funções**

O proteassoma é um complexo multiprotéico responsável pela degradação de proteínas intracelulares, um processo que requer energia metabólica (Tanaka, 2009). A

descoberta dessa maquinaria celular levou os pesquisadores Hershko, Ciechanover e Rose a ganharem o Prêmio Nobel de Química em 2004. Como regulador de uma variedade de substratos protéicos, o proteassoma participa de todas as funções celulares, e desta forma, tem seu papel já bem estabelecido em vários processos relacionados à carcinogênese, como proliferação, apoptose, angiogênese e metástase. Degradação proteolítica dependente de proteassoma é, portanto, essencial para a sobrevivência de células normais e neoplásicas (Voutsadakis, 2008).

A estrutura do proteassoma 20S é altamente conservada de leveduras a humanos, sendo também encontrado, em menor complexidade, em algumas archaeobactérias e procariotos (Rechsteiner & Hill, 2005). É constituído de 28 subunidades protéicas agrupadas em duas famílias distintas: alfa e beta, sendo as subunidades alfas estruturais e as subunidades betas catalíticas. Estudos utilizando microscopia eletrônica demonstraram a existência de uma estrutura cilíndrica, contendo um canal central, constituída de quatro anéis superpostos, sendo os dois anéis externos constituídos de sete subunidades alfa, e os dois anéis internos constituídos de sete subunidades beta, formando uma estrutura do tipo  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ . As subunidades do tipo beta contêm resíduos de treonina cataliticamente ativos em seus N-terminais, indicando que o proteassoma é uma treonina-protease (Tanaka, 2009). A subunidade  $\beta 1$  possui atividade do tipo caspase-símile e cliva preferencialmente após resíduos ácidos; a  $\beta 2$  é do tipo tripsina-símile e cliva preferencialmente após resíduos básicos, enquanto que a  $\beta 5$  é do tipo quimotripsina-símile clivando preferencialmente após resíduos hidrofóbicos. As contribuições relativas dos diferentes sítios ativos do proteassoma na hidrólise de proteínas, em células de mamíferos, são de interesse particular para a compreensão do impacto fisiológico e terapêutico de inibidores (Kisselev *et al.*, 2006). A estrutura do proteassoma 20S encontra-se ilustrada na figura 5.



**Figura 05: Estrutura do proteassoma 20S.** (a) Visão lateral do proteassoma 20S. Estrutura composta por quatro anéis superpostos com sete subunidades alfa distintas compondo os anéis mais externos, e sete subunidades beta distintas, compondo os anéis internos, sendo que as subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  possuem atividades semelhantes à caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente. (b) Corte transversal em um modelo de preenchimento do proteassoma 20S, mostrando em amarelo os sítios catalíticos. Adaptado de Rechsteiner & Hill, *Trends Cell Biol*, 15:27-33,2005.

O proteassoma 20S pode se associar a outros complexos como o PA700 (*Proteasome Activator MW700*, também conhecido como 19S ou Complexo Regulatório), PA28 (também conhecido como 11S ou REG) e ao PA200. Quando o complexo 20S se associa ao complexo regulatório 19S, ocorre a formação do proteassoma 26S, que está envolvido na degradação de proteínas poliubiquitinadas. O PA700 é constituído por diferentes subunidades, com massa molecular variando entre 10-110 kDa. Essas subunidades heterólogas são classificadas em dois subgrupos: subunidades com funções ATPásicas e não ATPásicas. O papel das ATPases está relacionado ao desenovelamento das proteínas e ao fornecimento da energia necessária para a degradação seletiva. As subunidades não ATPásicas, como RPN10 e RPN11, apresentam funções de reconhecimento de proteínas poliubiquitinadas e ação desubiquitinadora, respectivamente (Tanaka, 2009; Hanna & Finley, 2007). Em contraste com o PA700, PA28 e PA200 não reconhecem proteínas ubiquitinadas e não necessitam de ATP. Diversos resultados experimentais demonstraram que o proteassoma 20S, ligado ao ativador PA28 está envolvido com o sistema imune, mais especificamente no processo de apresentação de antígenos (Rechsteiner & Hill, 2005). Já o PA200, o ativador de proteassoma mais recentemente descoberto, acredita-se estar envolvido com o reparo do DNA (Ustrell *et al.*, 2002).

A ubiquitina é um polipeptídeo constituído por 76 aminoácidos, presente em todas as células eucarióticas, sendo encontrada no citosol, núcleo e superfície celular. Em eucariontes superiores, um dos papéis da ubiquitina é marcar proteínas que serão degradadas via proteassoma. Esse processo requer a participação sequencial de três famílias de enzimas: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e enzima ligante de ubiquitina (E3) (Elsasser & Finley, 2005; Wilkinson, 1995).

Para a ubiquitinação de uma proteína alvo, inicialmente ocorre a formação de uma ligação tio-éster entre a carboxila terminal da ubiquitina e o grupo sulfidríla da enzima ativadora de ubiquitina, sendo uma reação dependente de ATP. Posteriormente, a ubiquitina ativada é transferida para uma sulfidríla da enzima conjugadora de ubiquitina e, finalmente, a enzima ligante de ubiquitina catalisa a transferência da ubiquitina de E2 para a proteína alvo. Após sucessivos ciclos, as proteínas alvo vão se tornar poliubiquitinadas, sendo então os alvos para degradação pelo proteassoma 26S (Wilkinson, 1995). É importante ressaltar que o processo de ubiquitinação é reversível, e a remoção da molécula de ubiquitina ligada ao substrato alvo se dá através de enzimas desubiquitinadoras (Amerik & Hochstrasser, 2004).

A inibição da atividade do proteassoma pode influenciar várias funções celulares. Nesse sentido, a utilização desses inibidores mostrou múltiplos efeitos celulares, além de promover efeitos antiinflamatórios, anticarcinogênicos, antiproliferativos e apoptóticos em células com desenvolvimento anormal, como as cancerígenas (Chen *et al.*, 2005).

Alguns inibidores sintéticos permeáveis à membrana foram desenvolvidos para inibirem a atividade do proteassoma: MG-132 (N-carbobenzoxi-leucinil-leucinil-leucinal), PSI (N-carbobenzoxi-L-gama-t-butil-L-glutamil-L-alanil-L-leucina) e o inibidor peptídico do tipo não-aldeído Z-L3VS (carboxibenzil-leucil-leucil-leucina vinil sulfona), que são utilizados frequentemente em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, precauções devem ser tomadas quando da inferência sobre as funções do proteassoma, visto que tais inibidores sintéticos não inibem somente o proteassoma, mas também cisteíno-proteases como calpaínas e catepsinas lisossomais. No entanto, em contraste com esses inibidores, metabólitos microbianos como lactacistina e

epoxomicina foram determinados como inibidores seletivos do proteassoma, não afetando outras proteases investigadas até o momento (Tanaka, 2009).

Estruturas de inibidores mais seletivos do proteassoma tais como o PR39 e o PR11 foram recentemente elucidadas. O PR39 é um peptídeo constituído por 39 aminoácidos rico em resíduos de prolina e arginina, 49% e 24% respectivamente; ocorrendo naturalmente e sendo permeável às células. O PR39 é capaz de inibir seletivamente a degradação proteolítica de algumas cadeias polipeptídicas, como o I $\kappa$ B $\alpha$ , através de uma ligação não-competitiva na subunidade  $\alpha$ 7 do proteassoma 20S, gerando grandes mudanças estruturais no complexo (Anbanandam *et al.*, 2008; Tanaka, 2009). O PR11 compreende os primeiros 11 resíduos do PR39 e também foi capaz de inibir o proteassoma 20S (Anbanandam *et al.*, 2008).

Bortezomib, também conhecido como *Velcade* ou PS-341, provou ser um inibidor de proteassoma altamente efetivo em algumas neoplasias hematológicas. Este composto foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de mielomas múltiplos e está sendo utilizado clinicamente em mais de 85 países (Cavo, 2006). Além disso, estudos pré-clínicos demonstraram que a inibição do proteassoma potencializou a atividade de outros agentes terapêuticos, e particularmente, a combinação da inibição do proteassoma com novas terapias alvo é um campo emergente na oncologia (Tanaka, 2009).

Diversos estudos indicam que o bloqueio do sítio quimotripsina-símile do proteassoma causa uma ampla redução nas taxas de proteólise e é essa atividade que está associada com a sobrevivência das células tumorais e resistência a drogas. A maioria dos inibidores específicos da atividade quimotripsina-símile do proteassoma são capazes de induzir a apoptose de células cancerígenas e suprimir o crescimento tumoral em diversos modelos experimentais, sendo utilizados também como potenciais agentes anti-câncer em testes clínicos. Desta forma, a inibição do proteassoma oferece um campo promissor para o desenvolvimento de agentes quimiopreventivos ou terapêuticos (Kisselev *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005).

### 1.7.2. Interação do BBI com o Proteassoma

O BBI tem sido um importante alvo nas pesquisas envolvendo inibidores de proteases por possuir atividade inibitória anti-quimotripsina, que está diretamente envolvida com a atividade anti-carcinogênica. Neste sentido, faz-se necessário destacar que os inibidores de protease anticarcinogênicos mais potentes são aqueles com a habilidade em inibir a quimotripsina ou proteases quimotripsina-símile (Kennedy, 1998). O BBI possui propriedades anti-inflamatórias e rádio-protetoras, sendo também capaz de inibir a produção de radicais livres e a transformação induzida por carcinógenos. Além disso, o BBI possui a capacidade de reverter a iniciação do processo carcinogênico e os níveis elevados de radiação bem como os níveis de carcinógenos de muitos oncogenes, como *c-myc* e *c-fos*. Apesar de o BBI possuir um amplo espectro de atividades câncer-protetoras, o exato mecanismo pelo qual esse inibidor exerce seus efeitos anticarcinogênicos permanece por ser elucidado (Billings *et al.*, 1990; Kennedy, 1994; Chang *et al.*, 1990).

Um estudo realizado por Chen *et al.* (2005), utilizou o BBI isolado do grão de soja a fim de verificar se a atividade inibitória anti-quimotripsina do BBI poderia inibir também a atividade quimotripsina-símile do proteassoma 26S. Os autores demonstraram que o BBI inibiu especificamente a atividade quimotripsina-símile proteassomal *in vitro* e *in vivo* em células MCF7 isoladas de câncer de mama. Foi ainda demonstrado que tal inibição está associada ao acúmulo de substratos ubiquitinados e com uma diminuição nos níveis de ciclinas regulatórias do ciclo celular. Os autores sugerem que a inibição da atividade do proteassoma pelo BBI poderia contribuir para seu efeito preventivo no câncer.

Evidências adicionais da interação BBI e proteassoma foram descritas por Saito *et al.* (2007), os quais demonstraram que o BBI também suprimiu a atividade quimotripsina-símile do proteassoma em células de osteosarcoma. De maneira específica o BBI inibiu a degradação da conexina 43 pelo sistema ubiquitina-proteassoma neste modelo tumoral. Sugere-se que o efeito antiproliferativo observado seja devido à atuação da conexina como proteína supressora de tumor através da manutenção do controle homeostático em organismos multicelulares via junções GAP.

Estudo realizado por Suzuki *et al.* (2005) reportaram que o BBI suprimiu o desenvolvimento de sarcoma ovariano em células M5076 e induziu elevação da proteína conexina 43 no mesmo sarcoma.

### 1.8. A leguminosa *Macrotyloma axillare*

A *Macrotyloma axillare* (figuras 6 e 7) é uma leguminosa rasteira, perene, constituída de caules pilosos e com folhas verdes brilhantes trifoliadas. Suas flores são amarelas esverdeadas e as vagens pilosas são ligeiramente reclinadas, contendo de sete a oito sementes por vagem. A *M. axillare* é uma planta de origem africana, com distribuição abundante na África Tropical, podendo ser cultivada em países de clima tropical e subtropical (*United States Department of Agriculture - Plants Database*, 2003). Esta leguminosa é utilizada normalmente como forragem, ou seja, como pastagem e alimentação para o gado; apresenta boa produtividade em solos argilosos ricos em fosfatos. A *M. axillare* cresce vigorosamente no verão, continua crescendo durante o outono, suportando bem as estações secas como o inverno e continua a crescer na primavera (*Better Pastures for the Tropics and Subtropics*, 2003).



**Figura 06:** A leguminosa *Macrotyloma axillare*. À esquerda, foto da planta adulta, e à direita foto das sementes. Adaptada de *FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2003.

### 1.8.1. Classificação Sistemática da *Macrotyloma axillare*

- Sinonímia: *Dolichos axillaris* (E. Meyer); *Clitoria vividiflora* (Boulton);
- Nomes Comuns: *Archer* (Austrália), Grama de cavalo (*Perennial horsegram*);
- Informações Taxonômicas (*United States Department of Agriculture - Plants Database, 2003*):

1. Reino: *Plantae* - Plantas
2. Sub-Reino: *Tracheobionta* - Traqueófitas (plantas vascularizadas)
3. Superdivisão: *Spermatophyta* - Plantas com sementes
4. Divisão: *Magnoliophyta* - Plantas com Flores
5. Classe: *Magnoliopsida* - Dicotiledôneas
6. Sub-classe: *Rosidae*
7. Ordem: *Fabales*
8. Família: *Fabaceae* - Família das ervilhas
9. Gênero: *Macrotyloma* (Wight & Arnott) Verdc.
10. Espécie: *Macrotyloma axillare* (E. Meyer) Verdc.



**Figura 07:** Ilustração esquemática da *Macrotyloma axillare*. (1) Ramos de folhas e caule, (2) Flor e (3) Vagem com sementes. Adaptado de *Better Pastures for the Tropics and Subtropics*, 2003.

## *2. Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Estudos prévios realizados nesse laboratório (Santos, 2006) e resultados da literatura demonstraram que o Inibidor Bowman-Birk obtido da soja e da semente de *Macrotyloma axillare* apresentaram uma distribuição farmacocinética muito limitada ao compartimento central (sangue) com pequena distribuição para os tecidos. Essa limitação para a disponibilização do inibidor, do ponto de vista terapêutico, poderá ser sanada com a utilização de formas pequenas do inibidor dotadas da mesma atividade. Os BBI vem sendo alvo de vários estudos envolvendo o proteassoma por sua capacidade em inibir as atividades peptidásicas deste complexo, cuja atividade está intimamente ligada ao desenvolvimento tumoral. Nesse sentido, a obtenção de formas menores do BBI que produziriam alterações das atividades do proteassoma refere-se a uma abordagem interessante do ponto de vista terapêutico. Esperando encontrar resultados que atendam a essa expectativa, esse trabalho teve como objetivo geral a obtenção e caracterização estrutural e funcional de formas menores de Inibidores Bowman-Birk.

### 2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar peptídeos correspondentes ao *loop* antitripsina do Inibidor Bowman-Birk, segundo Gariani *et al.* (1999);
- Sintetizar peptídeos correspondentes ao *loop* antiquimotripsina do Inibidor Bowman-Birk, segundo McBride *et al.* (1996);
- Purificar os peptídeos;
- Identificar os peptídeos por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*;
- Fragmentar o Inibidor *Bowman-Birk* com ácido fórmico 2% para obter, de forma preparativa, as duas cabeças de inibição dissociadas e com atividades inibitórias preservadas;

- Identificar os fragmentos por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*;
- Avaliar a biodisponibilidade das formas reduzidas do BBI (peptídeos sintéticos e fragmentos) em segmento isolado de fígado de camundongos e compará-las com a biodisponibilidade da forma nativa do inibidor;
- Avaliar as atividades quimotripsina-símile, tripsina-símile e caspase-símile do proteossoma 20S em extrato citosólico de fígado na presença do inibidor nativo e das formas reduzidas do BBI.

### *3. Materiais e métodos*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Síntese peptídica**

Os peptídeos SCTKSIPPQCY e SCTFSLPPQCYGGGGG foram sintetizados sob a forma solúvel, utilizando-se um protocolo de síntese em fase sólida (resina) realizado conforme Merrifield (1963), com algumas modificações. Este processo requer a utilização de aminoácidos derivatizados, através de proteção do grupo amino com o composto Fmoc (*9-fluorenylmethyloxycarbonyl*). Caso sua cadeia lateral seja reativa, ela estará igualmente protegida por um grupo que deve responder às exigências de ser adaptado à natureza da cadeia lateral e ser clivado pelo TFA.

A síntese de peptídeos requer um suporte sólido insolúvel para o primeiro aminoácido, assim como para os demais a serem acoplados. A resina utilizada nesta síntese foi a *Amide Rink* 0,73  $\mu\text{mol/g}$  em concentração de 40  $\mu\text{mol/L}$ .

##### **3.1.1. Ativação da resina**

Para a ativação da resina seguiu-se o seguinte protocolo: 54 mg da resina foram colocados em um tubo de síntese com DMF suficiente para cobrir toda a resina, permanecendo sob agitação constante por três horas a 37 °C. Para a liberação do seu grupamento Fmoc, a resina foi coberta com 3 mL de piperidina 20% em DMF e lavada três vezes, por 10 minutos cada, com a solução mencionada, sob agitação contínua a temperatura de 37°C. Em seguida, a resina foi lavada três vezes com 5 mL de DMF por lavagem. Todas as lavagens foram realizadas com auxílio de uma bomba de vácuo.

*Toda a parte prática foi realizada em capela química, sempre com a utilização de luvas devido à toxicidade dos reagentes químicos empregados.*

### **3.1.2. Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados**

A síntese peptídica é iniciada a partir do aminoácido C-terminal do peptídeo. Os aminoácidos foram adicionados em concentrações três a quatro vezes maiores que a quantidade de resina para garantir o acoplamento. A quantidade despendida para cada aminoácido foi equivalente a 160  $\mu$ M. O primeiro aminoácido a ser acoplado é ligado pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amino da resina, formando uma ligação peptídica.

O primeiro aminoácido foi adicionado no tubo de síntese e para cada 160  $\mu$ M do aminoácido, foram acrescentados 21,6 mg de HOBt (hidroxibenzotriazol) e 25  $\mu$ L de DIPC (diisopropilcabodiimida). O HOBt e o DIPC são reagentes que permitem a ativação da função carboxílica dos aminoácidos Fmoc. Após 2 horas de agitação, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado com auxílio de uma bomba de vácuo e a resina lavada com DMF por três vezes, sendo então submetida ao teste da ninhidrina. Esse método é considerado o mais conveniente para o rápido monitoramento do processo de acoplamento. A ninhidrina reage com aminas primárias resultando na coloração conhecida como púrpura de Ruhemann (Albericio & Carpino, 1997). Após o acoplamento de cada aminoácido, uma pequena porção da resina foi colocada na presença de uma gota de ninhidrina 5% em etanol, duas gotas de fenol 80% em etanol (p/v) e uma gota de cianeto de potássio 0,001  $\mu$ mol/L em piperidina. O tubo contendo a resina foi aquecido por 3 minutos a 110°C. Caso o acoplamento tenha ocorrido de maneira satisfatória, a resina adquire cor laranja ou amarela. Do contrário, a resina adquire cor azul púrpura. Os ciclos foram repetidos até que o último aminoácido fosse acoplado. Com a obtenção de uma cor amarelada no teste, continuou-se normalmente a síntese. O grupamento amino desse primeiro aminoácido acoplado foi então desprotegido, lavando-se a resina com 3 mL de uma solução de piperidina 20% em DMF, por três vezes de 10 minutos cada, com agitação contínua a 37°C; sendo novamente submetido ao teste mencionado, mas dessa vez procurou-se obter a cor púrpura, indicando que o desbloqueio do grupo amino foi bem sucedido. O segundo aminoácido, com seu grupamento amino protegido, foi adicionado no tubo de síntese juntamente com o HOBt e DIPC e este foi processado exatamente como o anterior.

### **3.1.3. Clivagem do peptídeo**

Após o término dos ciclos de acoplamento, o último grupamento Fmoc foi eliminado com piperidina, como descrito previamente, e a resina lavada por quatro vezes, durante cinco minutos com DCM. As cadeias laterais foram desprotegidas e o peptídeo dissociado da resina pelo uso de uma solução de clivagem contendo 2.5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 2.5% de água em volume final de 5 mL de TFA. O tubo de reação permaneceu sob agitação com a solução por quatro horas. A solução contendo os peptídeos foi coletada com auxílio de uma bomba de vácuo e os produtos da síntese foram precipitados com éter etílico gelado durante a noite à 4 °C. O tubo foi lavado com éter e centrifugado por três vezes a 1500 g por 30 minutos. Na última etapa, o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspendido em água milli-Q. Após a obtenção do peptídeo, este foi liofilizado e submetido ao procedimento de ciclização.

### **3.1.4. Ciclização do peptídeo**

O processo de ciclização permite a formação de pontes dissulfeto entre as cadeias laterais de cisteínas por oxidação. Os peptídeos liofilizados foram dissolvidos em uma solução contendo 16% de DMSO, na razão de um volume final de 50 mL a completar com tampão acetato de amônio 50 mM, pH 7,4; sendo 8 mL de DMSO e 42 mL de tampão acetato para cada tubo contendo peptídeo. Os tubos foram submetidos à agitação por 48 horas na ausência de luz e novamente submetidos ao processo de liofilização. Os peptídeos foram purificados em sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e caracterizados em espectrômetro de massa IT-TOF do tipo *electrospray*.

### 3.1.5. Purificação e Caracterização dos Peptídeos Sintéticos

#### 3.1.5.1. Purificação dos peptídeos sintéticos antitripsina e antiqumotripsina

Os peptídeos sintetizados em fase sólida foram submetidos à cromatografia de fase reversa para a análise de sua pureza. As condições cromatográficas utilizadas para as análises foram: coluna 250 mm x 4,6 mm; FE: Varian OmniSpher C18, 5  $\mu$ L; FM: A: H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% ; B: ACN + TFA 0,1%; eluição por gradiente: 0 a 70% de B em 20 minutos chegando a 100% em 22 minutos e retornando a 0% em 27 minutos; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; detecção: UV em 280 nm. O peptídeo antitripsina foi purificado por cromatografia de troca iônica em *Q-Sepharose*<sup>®</sup> (Pharmacia LKB Biotechnology) de dimensões 1,0 cm x 1,0 cm equilibrada previamente com tampão acetato de amônio 0,01 M, pH 7,0. Foram recolhidos manualmente 25 frações de 1 mL cada, utilizando-se o mesmo tampão de equilíbrio como eluente. O fracionamento foi acompanhado pelo ensaio de atividade inibitória para a tripsina, como descrito no item 3.2.1.

O peptídeo antiqumotripsina foi purificado em fase reversa utilizando-se do mesmo procedimento descrito acima, entretanto com alteração no gradiente que variou de 0 a 100% de B em 10 minutos.

#### 3.1.5.2. Identificação dos peptídeos sintéticos por espectrometria de massa

Os peptídeos foram analisados pelo método IT-TOF usando o espectrômetro de massa LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray* (Shimadzu, Japão), que acopla ionização à pressão atmosférica com as tecnologias de *Íon Trap* (IT) e *Time of Flight* (TOF). O equipamento foi calibrado utilizando trifluoroacetato de sódio. A voltagem capilar foi de 4500 V no modo positivo de ionização, com tempo de acumulação de 10 Ms. As amostras foram diluídas em solução de 0.1% TFA e introduzidas no modo injeção direta. Os dados foram analisados usando o *software LCMSsolution*.

## 3.2 Atividades Inibitórias

### 3.2.1. Tripsina Bovina

A determinação da atividade anti-tripsínica foi realizada de acordo com Kumar *et al.* (2002). O substrato utilizado foi o cloridrato de *N*- $\alpha$ -benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (DL-BApNA), o qual foi preparado dissolvendo-se 196 mg do composto em 5 mL de DMSO para uma concentração final de  $9 \times 10^{-2}$ M. Esta solução foi mantida no congelador como solução estoque e diluída no momento do uso com Tris-HCl 0,1M contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH 8,1 para a concentração de  $9 \times 10^{-4}$ M.

Com o objetivo de encontrar um título que inibisse entre 40 e 60% a tripsina, foram realizadas diluições seriadas do inibidor. Nestes tubos foram adicionados 200  $\mu$ L de DL-BApNA, 20  $\mu$ L de tripsina a uma concentração de 0,05 mg/mL e 20  $\mu$ L do inibidor. Nos tubos brancos foram adicionados 200  $\mu$ L de substrato e 40  $\mu$ L de água, enquanto que os tubos controles de atividade enzimática continham 200  $\mu$ L de substrato, 20  $\mu$ L de enzima e 20  $\mu$ L de água.

Os tubos de reação foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 37°C por aproximadamente 40 minutos. A reação foi interrompida com 40  $\mu$ L de ácido acético 60% v/v seguido da adição de 250  $\mu$ L de água destilada. Posteriormente, a quantificação da atividade inibitória foi determinada pela medida da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro.

### 3.2.2. Quimotripsina Bovina

A determinação da atividade anti-quimotripsínica foi realizada de acordo com Kumar *et al.* (2002). O substrato usado foi o cloridrato de *N*- $\alpha$ -benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida (L-BTpNA) o qual foi preparado dissolvendo-se 182 mg do composto em 5 mL de DMSO para uma concentração final de  $9 \times 10^{-2}$ M. Esta solução foi mantida no congelador como solução estoque e diluída no momento do uso com Tris-HCl 0,1M

contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH 8,1 e DMSO na proporção de 80% e 20% respectivamente, para a concentração de  $9 \times 10^{-4}$ M.

Com o objetivo de encontrar um título que inibisse entre 40 e 60% a quimotripsina, foram realizadas diluições seriadas do inibidor. Nestes tubos foram adicionados 200 µL de L-BTpNA, 20 µL de quimotripsina a uma concentração de 0,07 mg/mL e 20 µL do inibidor. Nos tubos brancos foram adicionados 200 µL de substrato e 40 µL de água, enquanto que os tubos controles de atividade enzimática continham 200 µL de substrato, 20 µL de enzima e 20 µL de água.

Os tubos de reação foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 37°C por aproximadamente 60 minutos. A reação foi interrompida com 40 µL de ácido acético 60% v/v seguida da adição de 250 µL de água destilada. Posteriormente, a quantificação da atividade inibitória foi determinada pela medida da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro.

### **3.3. Fragmentação do Inibidor Bowman-Birk obtido da semente de *Macrotyloma axillare* (BBIM)**

O inibidor purificado da semente de *Macrotyloma axillare* foi obtido segundo Santos (2006). Esse trabalho foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do nosso Laboratório e encontra-se em fase de publicação. Para a fragmentação do BBIM utilizou-se 1 mL de inibidor em um título de inibição da tripsina de 1:512, 4 mL de água destilada e ácido fórmico para uma concentração final de 2%. A reação foi realizada em um microondas doméstico adaptado contendo um condensador de refluxo conectado ao balão volumétrico de reação, como pode ser visto na figura 8; com o objetivo de minimizar a evaporação da solução. Um béquer contendo água foi colocado abaixo do balão para absorver os reflexos da radiação dentro do equipamento. A amostra foi tratada por diferentes intervalos de tempo à potência de 800 W (potência 10 do aparelho).



**Figura 08: Microondas adaptado para a fragmentação do BBIM com ácido fórmico.** A - Ilustração do condensador incorporado no equipamento microondas. B - Ilustração interna do microondas. O balão volumétrico contendo a solução a ser fragmentada é preso no silicone de modo a evitar perda de amostra. Bêquer contendo aproximadamente 200 mL de água para absorver os reflexos da radiação.

Após o tratamento no microondas, 1 mL da amostra foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em resina *Sephadex G25<sup>®</sup>* - Pharmacia LKB *Biotechnology* de dimensões 1,0 cm x 50 cm equilibrada com água destilada. Foram recolhidos manualmente 32 frações de 2 mL cada, utilizando-se água destilada como eluente. Para a obtenção do cromatograma, foram determinadas as absorvâncias a 230 nm e 280 nm de cada fração por meio de um espectrofotômetro. O fracionamento também foi acompanhado pelo ensaio de atividade inibitória para tripsina e quimotripsina, como pode ser visto no ítem 3.2.

### 3.3.1. Identificação dos fragmentos por espectrometria de massa

Os fragmentos derivados da hidrólise do BBIM foram identificados por espectrometria de massa essencialmente como descrito no item 3.1.5.2. A determinação

da massa monoisotópica  $[M + H]^+$  de cada fragmento foi obtida da seguinte maneira: o programa *PeptideMass* disponível em <http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html> forneceu o valor da massa  $[M + H]$  para cada fragmento. Deste valor, foram subtraídos dois hidrogênios (MM do H = 1,008) para cada ponte dissulfeto contida no fragmento e finalmente adicionado um hidrogênio para a obtenção da massa  $[M + H]^+$ .

Para a análise das massas obtidas pela espectrometria, levou-se em consideração possíveis alterações de massa ocorridas durante a hidrólise. A formilação, por exemplo, é um processo que pode ocorrer durante a fragmentação com ácido fórmico, sendo caracterizada pela adição de um radical formila ( $CH_3CO$ , MM = 27,9941) nos resíduos de lisina, serina e treonina, e no N-terminal. Considerando-se as possibilidades de hidrólise intra-fragmento, pode ser necessária também a adição de uma molécula de água (MM = 18,015) por hidrólise.

### **3.3.2. Análise de fragmentação do BBIM através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%**

#### *Preparação dos géis de separação e concentração*

O suporte eletroforético utilizado foi um gel de poliacrilamida de separação a 15% e de concentração a 5 %, preparados em condições desnaturantes (com SDS), segundo o método de Laemmli (1970).

Assim, os géis foram preparados pela mistura dos seguintes reagentes:

- Solução tampão Tris 1,5M pH 8,8 no gel de separação e solução tampão Tris 0,5M pH 6,8 no gel de concentração;
- Solução de acrilamida 30% p/v + bis-acrilamida 1% p/v;
- Solução de SDS a 10% p/v;
- Solução de persulfato de amônio a 10% (preparo recente);
- *TEMED*;
- Água milli-Q q.s.p 10 mL.

#### *Preparo das amostras para eletroforese*

As concentrações das amostras (BBIM não fragmentado e BBIM fragmentado) foram determinadas pelo método de Lowry *et al.* (1951). As amostras foram reduzidas com DTT 10 mM por 30 minutos à 65°C no bloco térmico e posteriormente alquiladas com iodoacetamida 40 mM por 1 hora à temperatura ambiente na ausência de luz. Esses tratamentos foram necessários pois as amostras contém muitas pontes dissulfeto que levariam a uma migração atípica das bandas. As amostras foram diluídas no tampão da amostra 1:1 contendo Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; azul de bromofenol 0,002% p/v, SDS 4% p/v e glicerol 20% v/v e então tratadas em banho de água fervente por 5 minutos para desnaturação total das proteínas. O tampão de corrida eletroforética foi composto por Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1% p/v pH 8,2. Utilizou-se uma mistura de isoformas de ConA de massas moleculares 30, 23, 17, e 13 kDa como padrão de massa molecular. A eletroforese foi realizada a uma corrente elétrica de 20 mA por placa, durante aproximadamente 90 minutos.

#### *Protocolo de coloração pelo Coomassie Blue*

A coloração do gel de eletroforese foi realizada pelo tratamento com uma solução de *Coomassie Blue* R-250 0,025% em metanol 40% e 7% de ácido acético sob agitação branda por 2 horas. O gel foi descorado por meio de uma solução de 40% de metanol e 7% de ácido acético até a visualização das bandas.

### **3.3.3. Separação das cabeças inibitórias obtidas por fragmentação do BBIM utilizando o Filtro *Amicon Ultra-4 3000 Da***

Primeiramente foi determinado o título inibitório da amostra fragmentada, conforme metodologia descrita no item 3.2. Para os experimentos subsequentes utilizou-se um título de no mínimo 1:512 para a tripsina e 1:16 para a quimotripsina. O filtro *Amicon Ultra-4 3000 Da* foi carregado com 1mL do BBIM fragmentado e levado para centrifugação a 7100 g a 25°C por 15 minutos. O volume final retido no filtro foi de aproximadamente 100 µL, já que a membrana filtrante não poderia ressecar. O filtro foi reconstituído para 1000 µL com água destilada e a solução resultante

homogeneizada com uma pipeta. Essa seqüência de filtração foi realizada por mais três vezes. Em cada filtração retirou-se uma alíquota de 40 µL das frações retidas e filtradas para posterior avaliação da atividade inibitória. Ao final das quatro lavagens, o filtro foi carregado para 1000µL com água destilada, agitado levemente e o material resultante armazenado.

Para a determinação das percentagens de atividade retidas no filtro e percentagens de atividade encontrada na solução filtrada, todas as amostras recolhidas foram diluídas até o título de 1:256 e submetidas ao ensaio de atividade inibitória para tripsina e quimotripsina, como descrito no item 3.2. O cálculo da percentagem de atividade inibitória foi assim determinado:

$$\% \text{ inibição} = 1 - (\text{AEI}/\text{AE}) \times 100, \text{ em que:}$$

AEI = Absorbância a 410nm do ensaio de inibição da atividade enzimática (inibidor + enzima + substrato) que inibiu entre 40 e 60% as enzimas;

AE = Absorbância a 410nm do ensaio de atividade enzimática controle (enzima + substrato)

Um gráfico com as percentagens de atividade inibitória para tripsina e quimotripsina retidas no filtro foi construído a partir das quatro filtrações realizadas.

### **3.4. Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM, BBIM fragmentado e peptídeos sintéticos em íleo isolado de camundongos BALB/c**

#### *Dissecação dos segmentos de íleo*

Os camundongos BALB/c jovens foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida fixados com alfinetes, na posição supino, em suporte de isopor revestido com papel alumínio. Incisões abdominais no sentido caudal-cranial foram realizadas para exposição das vísceras. Os intestinos dos animais foram alinhados para a identificação do intestino grosso seguida por secção de 10 cm de íleo que foi imediatamente imerso em solução fisiológica de Tyrode ( NaCl 136 mM, KCl 2,6 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,98 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,26 mM, glicose 5,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 11,9 mM , CaCl<sub>2</sub> 2 mM, para 1 litro), para a garantia da vitalidade dos órgãos.

#### *Lavagem dos segmentos intestinais*

Após imersos em placas de Petri contendo solução fisiológica de Tyrode, os segmentos intestinais foram lavados extensivamente com o auxílio de uma pinça, a fim de garantir que nenhum resto alimentar permanecesse nos órgãos. Foram adicionados também cerca de 4 mL de Tyrode no interior dos íleos utilizando uma pipeta de 1000 µL. Este procedimento foi realizado com cuidado de modo a evitar dano ao tecido.

#### *Preparação dos inibidores*

Os inibidores utilizados foram o BBIM íntegro, os peptídeos sintéticos antitripsina e antiquimotripsina e o BBIM fragmentado. Todos os inibidores deveriam estar no título de 1:512 para o ensaio de inibição da tripsina e quimotripsina.

#### *Absorção in vitro dos inibidores*

Os segmentos intestinais foram amarrados em uma das extremidades com linha de sutura. Com o auxílio de uma pipeta de 100 µL foram adicionados 30 µL do inibidor a partir da outra extremidade, que foi então amarrada cuidadosamente. Os intestinos foram colocados dentro de tubos de ensaio de vidro contendo previamente 3 mL de solução de Tyrode cada, com a cautela de manter as extremidades dos íleos fora da solução. Imediatamente após os intestinos serem imersos nos tubos de ensaio, foram retiradas alíquotas de 40 µL do meio de imersão para o tempo zero, e os tubos levados para o banho-maria a fim de manter a temperatura de 25°C constante. Durante as sete horas de experimento, foram retiradas alíquotas de 40 µL de acordo com a tabela 1. As alíquotas foram armazenadas no gelo durante todo o experimento. Para a análise das atividades inibitórias antitripsina e antiquimotripsina foram realizadas diluições seriadas de cada alíquota até o título de 1:32 com solução fisiológica de Tyrode.

**Tabela 1: Intervalos de tempo associados à determinação da atividade das diferentes formas de inibidores durante absorção *in vitro*.**

Tempos	Minutos
T0	0
T1	30
T2	60
T3	120
T4	150
T5	180
T6	210
T7	240
T8	300
T9	360
T10	420

Para o controle do experimento foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do inibidor em um tubo de ensaio de vidro contendo 3 mL de Tyrode, a fim de representar 100% de transferência. Alíquotas de 40  $\mu\text{L}$ , em triplicata, foram diluídas em série e submetidas ao ensaio de atividade inibitória para tripsina ou quimotripsina, dependendo do tipo de inibidor em teste.

Os cálculos das percentagens de transferência dos inibidores foram realizados para cada tempo, da seguinte maneira:

- % inibição =  $1 - (\text{AEI}/\text{AE}) \times 100$ , em que:

AEI = Absorbância a 410 nm do ensaio de inibição da atividade enzimática (inibidor + enzima + substrato) que inibiu entre 40 e 60% as enzimas;

AE = Absorbância a 410 nm do ensaio de atividade enzimática controle (enzima + substrato)

- Atividade Inibitória (AI) = % inibição x título do inibidor que inibiu entre 40 e 60% as enzimas;
- $T = \text{AI do controle} \times 3000 \mu\text{L}$
- Percentagem de transferência (% Transferência) =  $(\text{AI} \times \mu\text{L restantes no tubo de ensaio}^*) \div T \times 100$ ;

\* A cada tempo são retirados 40  $\mu\text{L}$  que devem ser corrigidos nos cálculos, já que esse volume não é repostado. Por exemplo: no tempo T8 restam 2680  $\mu\text{L}$  no tubo de ensaio, pois já foram retirados 320  $\mu\text{L}$  do tempo T0 ao T7.

Para a construção dos gráficos foram plotadas as médias das triplicatas com os erros padrões da média, utilizando o *software GraphPad Prism 5*. As análises estatísticas das curvas foram realizadas utilizando-se o *software Minitab 15 Statistical Software*.

### **3.4.1 Recuperação da atividade inibitória dos peptídeos sintéticos antitripsina e antiqumotripsina em homogenato de íleo isolado**

#### *Preparação dos homogenatos:*

Os segmentos intestinais utilizados para os ensaios de absorção *in vitro* dos peptídeos sintéticos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . A preparação dos homogenatos protéicos a partir desses segmentos foi realizada em *Potter*, com o equipamento funcionando na velocidade máxima. Foram processados 123 mg do segmento intestinal utilizado para avaliar a absorção *in vitro* do peptídeo antitripsina e 143 mg do segmento do peptídeo antiqumotripsina, em volume final de 6 mL de HCl pH 2,0 para cada órgão. Os mucos intestinais de cada segmento foram obtidos antes da maceração dos órgãos e processados a homogenatos nas mesmas condições, em volume final de 3 mL. Foi adicionado Triton-X-100 para uma concentração final de 0,1% em cada homogenato, e então sonificado em Sonifier 250 Branson por 30 segundos a 30W e levados para a centrifugação a 13000 g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para a realização das seguintes análises:

#### *Avaliação da formação de complexo protéico capaz de seqüestrar o peptídeo*

Para a avaliação da formação de um complexo protéico capaz de seqüestrar o peptídeo foi aplicado 1 mL do sobrenadante do homogenato do íleo em coluna *Sephadex G25 (Pharmacia LKB Biotechnology)* de dimensão 1,3 cm x 10 cm equilibrada previamente com tampão HCl pH 2,0. A eluição foi realizada com o mesmo

tampão de equilíbrio e coletadas manualmente 20 frações de 1 mL cada. Os valores das absorbâncias foram obtidos em 230 nm e 280 nm por meio de um espectrofotômetro e submetidos ao *software Microsoft Office Excel 2003* para a obtenção do cromatograma. O fracionamento foi acompanhado pelo ensaio de atividade inibitória para as 20 frações, utilizando-se substrato específico, como descrito no item 3.2, com o objetivo de detectar os peptídeos nas frações. Esse procedimento foi realizado para o sobrenadante dos quatro homogenatos processados.

*Avaliação da decomposição do peptídeo por redução de ponte dissulfeto por enzimas intracelulares*

Para essa investigação foi necessário 1 mL do sobrenadante do homogenato do íleo ajustado para o pH 8,5 com NH<sub>4</sub>OH, confirmado por meio de fita de pH. Para a redução das pontes dissulfeto foi adicionado DTT para uma concentração final de 0,05 M e incubado por 90 minutos a 37°C. Em seguida, o pH foi ajustado para 2 com HCl concentrado utilizando-se fita de pH. A amostra foi então submetida à cromatografia de exclusão molecular utilizando-se uma coluna *Sephadex G25 (Pharmacia LKB Biotechnology)* de dimensão 1,3 cm x 10 cm equilibrada previamente com tampão HCl pH 2,0. A eluição foi realizada com o mesmo tampão de equilíbrio, e foram coletadas manualmente 20 frações de 1 mL cada. Os valores das absorbâncias foram obtidos em 230 nm e 280 nm por meio de um espectrofotômetro e submetidos ao *software Microsoft Office Excel 2003* para a obtenção do cromatograma.

As frações 8 a 20 da cromatografia realizada para o homogenato do segmento intestinal e muco correspondente ao peptídeo antitripsina e as frações 4 a 12 da cromatografia dos homogenatos correspondentes ao peptídeo antiqumotripsina foram concentradas em *speed vac* (300 µL de cada fração), sendo essas as frações referentes às proteínas que ficaram retidas na matriz do gel de filtração. Após concentradas, foram submetidas ao procedimento de ciclização. Cada amostra foi ressuspensa em 80 µL de acetato de amônio 50 mM pH 7,4 e 20 µL de DMSO que permaneceram sob agitação branda por 60 horas na ausência de luz. Após esse procedimento as amostras foram submetidas ao ensaio de atividade inibitória, utilizando-se substrato específico, como

descrito no item 3.2, com o objetivo de avaliar se as pontes dissulfeto dos peptídeos foram reconstituídas.

### **3.5. Construção da tabela comparativa das atividades específicas e IC<sub>50</sub> das diferentes formas do BBIM**

Para a determinação das atividades específicas das diferentes formas do inibidor BBIM, foram necessários os seguintes cálculos para a construção da tabela comparativa:

- Massa Total de Proteína: concentração de proteína<sup>1</sup> multiplicada pelo volume;
- Atividade Inibitória: título da solução de amostra que inibiu entre 40 e 60% as enzimas, multiplicado pela porcentagem de inibição<sup>2</sup> obtida;
- Atividade Total: atividade da alíquota multiplicada pelo volume;
- Atividade Específica: atividade total dividida pela massa total de proteína.

1: A determinação da concentração proteica de cada forma de inibidor foi realizada utilizando-se o método do BCA (Smith *et al.*, 1985). Para a construção da curva-padrão foi utilizada uma solução de soroalbumina bovina a 1mg / mL em diversas diluições.

2:  $1 - (AEI/AE) \times 100$ , onde:

AEI = Absorbância a 410nm do ensaio de inibição da atividade enzimática (inibidor + enzima + substrato);

AE = Absorbância a 410nm do ensaio de atividade enzimática controle (enzima + substrato)

O IC<sub>50</sub> foi determinado por meio de curvas de percentagem de inibição em função do logaritmo da concentração molar dos inibidores, empregando-se os métodos de medida das atividades inibitórias, como descrito no item 3.2.

### **3.6. Influência das diferentes formas de inibidores sobre a atividade do proteassoma**

#### **3.6.1. Obtenção do extrato citosólico de segmento de fígado de camundongos BALB/c**

Três camundongos BALB/c jovens (5 a 7 meses) foram sacrificados e os fígados obtidos conforme descrito no item 3.4. Os homogenatos dos fígados foram preparados com 3 mL de tampão 20S (Tris-HCl 25 mM, DTT 1 mM, Glicerol 10%, PMSF 10 µM,

TPCK 10  $\mu$ M, TLCK 10  $\mu$ M, NEM 10  $\mu$ M, EDTA 1 mM e EGTA 1 mM) e sonificados em Sonifier 250 Branson por três vezes a uma frequência de 30 W de 40 segundos com intervalo de 40 segundos em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 10.000 g e o sobrenadante dessa centrifugação foi submetido à ultracentrifugação por 60 minutos a 100.000 g. A determinação da concentração protéica no sobrenadante foi realizada utilizando-se o método do BCA (Smith *et al.*, 1985). Para a construção da curva-padrão foi utilizada uma solução de soroalbumina bovina a 100  $\mu$ g / mL em diversas diluições.

### **3.6.2. SDS – PAGE**

Cerca de 10  $\mu$ g do extrato citosólico de fígado dos camundongos jovens foram fracionados em gel de SDS-PAGE 12%, como descrito por Laemmli *et al.* (1970). Utilizou-se como padrão de peso molecular o *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). A voltagem adotada foi de 120 V. Após a corrida, o gel foi corado com *comassie blue*.

### **3.6.3. Avaliação das atividades peptidásicas do proteossoma na presença de inibidores derivados do BBI**

Nos ensaios da atividade proteolítica foram utilizados os substratos fluorogênicos Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-metilcumarina (BIOMOL *Biotechnology*), Cbz-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina (BIOMOL *Biotechnology*) e Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (BIOMOL *Biotechnology*) para a determinação das atividades semelhantes a caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente.

Foram utilizados 10  $\mu$ g de proteínas totais dos extratos dos fígados. Os inibidores utilizados foram o BBIM, peptídeos sintéticos antitripsina e anti-quimotripsina, BBIM fragmentado e BBIM fragmentado rico em cabeça antitripsina; em um título de inibição correspondente a 1:128, diluído 10 vezes. O tampão reacional utilizado foi o Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 0,1 mM e 13  $\mu$ M de cada substrato fluorogênico. O ensaio foi realizado em um volume final de 200  $\mu$ L. Após a adição das proteínas totais, dos inibidores e da água milli-Q (para completar 150  $\mu$ L), a reação foi incubada por 5

minutos a 37°C e imediatamente após esse tempo, adicionou-se o tampão reacional e os tubos foram agitados em vortex. Ao tubo branco foi adicionado 150 µL de água milli-Q e o tampão reacional; e no tubo controle o inibidor não foi adicionado. A reação de hidrólise ocorreu por 30 minutos a 37°C na ausência de luz. Para interromper a reação foram adicionados a cada tubo 2 mL de etanol. As leituras fluorimétricas foram realizadas nos comprimentos de onda de 380 nm de excitação e 440 nm de emissão, utilizando-se o espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão). Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência por µg de proteínas por hora. A análise estatística dos ensaios foi realizada por meio do *software SPSS for Windows*, em que foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar se existia diferença entre os grupos. Havendo diferença, foi realizado comparação dois a dois usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

## *4. Resultados e discussão*

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Síntese peptídica

#### 4.1.1. Síntese e análise do peptídeo sintético antitripsina

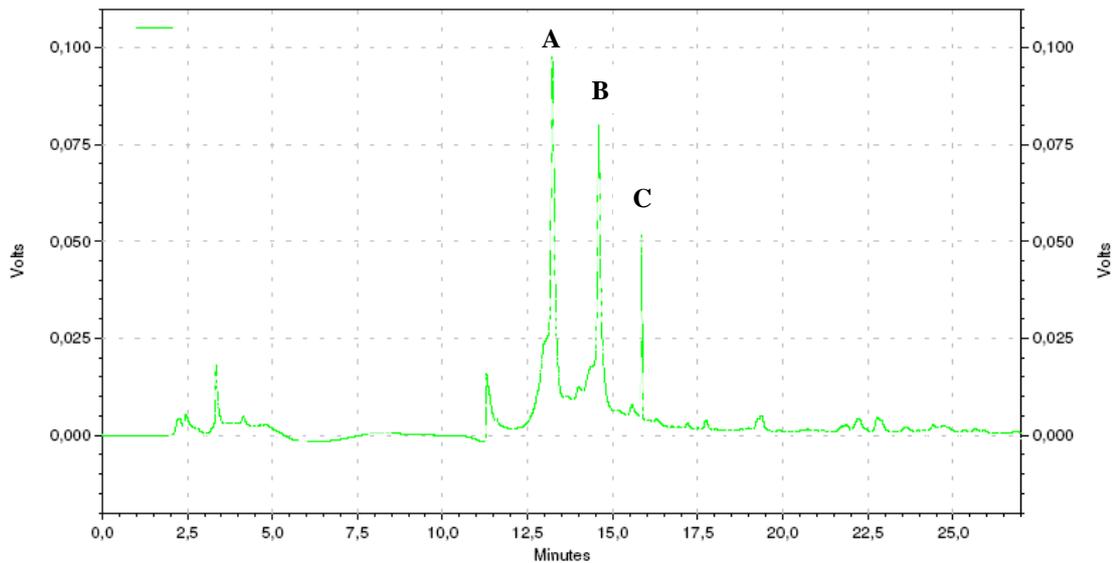
O peptídeo SCTKSIPPQCY com seqüência apresentando maior atividade antitripsina devido à presença do aminoácido isoleucina em P2', como descrito por Gariani *et al.* (1999), foi sintetizado em fase sólida pelo método proposto por Merrifield (1963). O produto dessa reação foi submetido à cromatografia de fase reversa para a análise de sua pureza. Como pode ser visto na figura 9, há a predominância de três picos principais (A, B e C), que posteriormente foram analisados por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*. A figura 10 ilustra os dados espectrométricos do peptídeo proposto, sendo que este foi encontrado no pico A.

As estruturas dos diferentes peptídeos obtidos no processo de síntese foram identificadas através das massas determinadas a partir dos principais picos do cromatograma apresentado na figura 9. Assim sendo, o pico A apresentou massa molecular de 1225,55 Da equivalente ao peptídeo proposto, e os picos B e C de massas 918,53 Da e 924,60 Da correspondem às estruturas SCCTSIPCC e CCTSIPCC, respectivamente. É importante ressaltar que a presença de outros peptídeos nas análises, diferindo do peptídeo proposto, é devida a uma falha na incorporação de alguns aminoácidos durante o processo de síntese, podendo gerar outros peptídeos maiores ou menores, no entanto, tal falha é freqüente em rotinas da síntese peptídica.

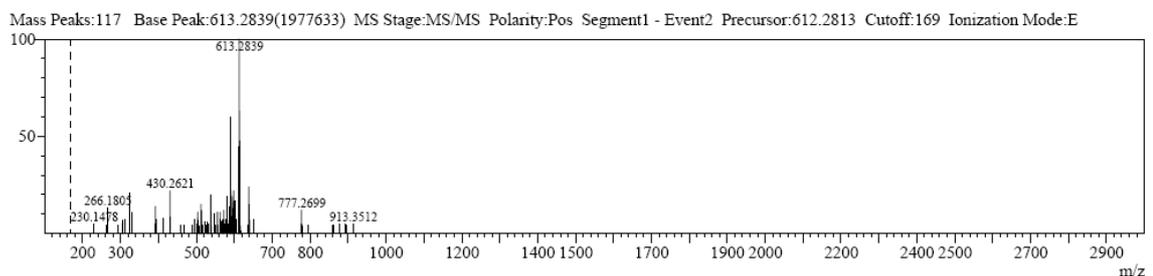
A identificação das estruturas dos peptídeos permitiu então o cálculo dos seus pontos isoelétricos (pI), sendo que o peptídeo pretendido possui pI=7,78, os peptídeos do pico B, 5,23 e C, 5,5. Tendo em vista a grande diferença entre os pIs dos peptídeos identificados nos picos B e C em relação ao peptídeo proposto, decidiu-se por separá-los pela diferença de cargas, em pH 7,0, utilizando-se a cromatografia de troca iônica.

Em uma coluna de *Q-sepharose* equilibrada com acetato de amônio 0,01M, pH 7,0 foram retidos os peptídeos com pI próximo de 5, enquanto o inibidor com pI acima de 7 apareceu nas frações de peptídeos não retidos à coluna. Após essa separação, a amostra

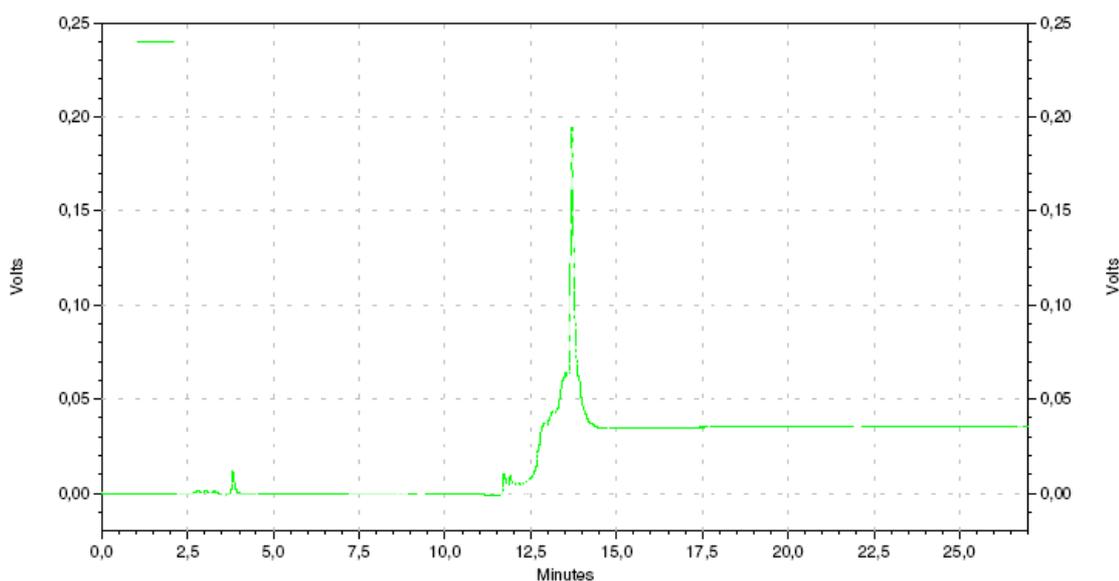
foi novamente submetida à cromatografia de fase reversa, nas mesmas condições, e apresentou um cromatograma com apenas um componente principal (figura 11), indicando que a purificação em escala preparativa do material de síntese foi bem sucedida.



**Figura 09: Análise cromatográfica em fase reversa do peptídeo antitripsina SCTKSIPPQCY.** A, B e C referem-se aos três picos observados no cromatograma. Condições cromatográficas: coluna 250 x 4,6 mm; FE: Varian OmniSpher C18, 5  $\mu$ L; FM: A: H<sub>2</sub>O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,1%; eluição por gradiente: 0 a 70% de B em 20 minutos chegando a 100% em 22 minutos e retornando a 0% em 27 minutos; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup> detecção: UV em 280 nm.



**Figura 10: Identificação do peptídeo antitripsina SCTKSIPPQCY (pico A, figura 9) por espectrometria de massa em LCMS IT-TOF do tipo *electrospray*.** O pico principal mostrado no espectro (613.2839) apresenta carga 2<sup>+</sup>, gerando o peptídeo proposto de massa molecular 1225,55 Da.



**Figura 11: Análise cromatográfica em fase reversa do peptídeo antitripsina purificado em coluna de *Q-sepharose*.** Nota-se a obtenção de um pico único com tempo de retenção em torno de 13 minutos correspondente ao peptídeo SCTKSIPPQCY. Condições cromatográficas: coluna 250 x 4,6 mm; FE: Varian OmniSpher C18, 5  $\mu$ L; FM: A: H<sub>2</sub>O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,1%; eluição por gradiente: 0 a 70% de B em 20 minutos chegando a 100% em 22 minutos e retornando a 0% em 27 minutos; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup> detecção: UV em 280 nm.

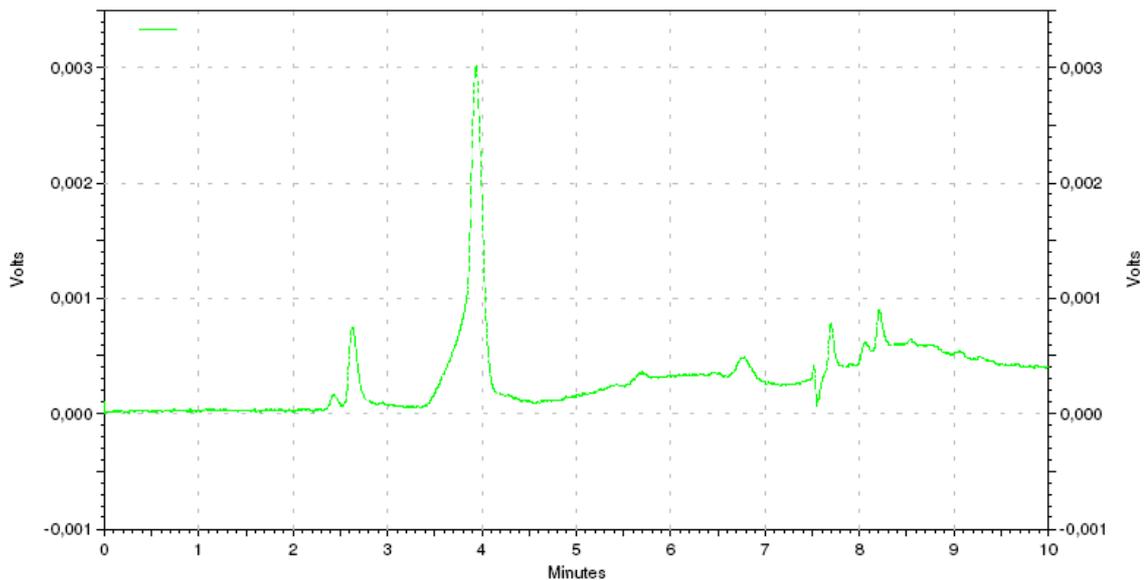
A atividade inibitória do peptídeo SCTKSIPPQCY antitripsina foi determinada a partir do ensaio de inibição da tripsina, utilizando-se o substrato específico DL-BAPNA, como descrito no item 3.2.1.

#### 4.1.2. Síntese e análise do peptídeo sintético antiqumotripsina

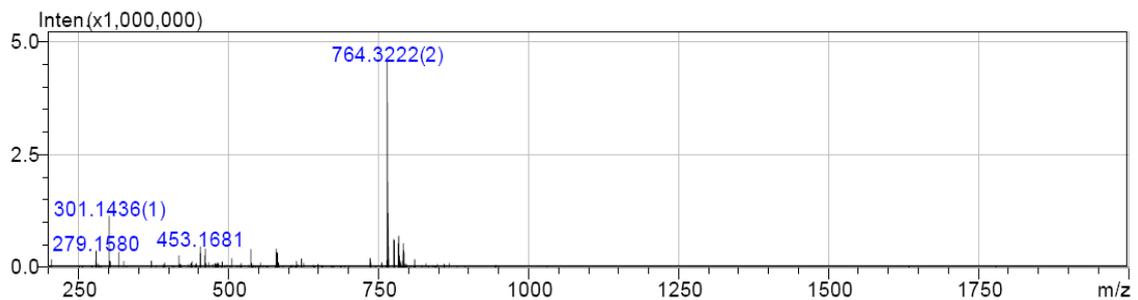
O peptídeo SCTFSLPPQCYGGGGG com seqüência apresentando atividade antiqumotripsina, como descrito por McBride *et al.* (1996), foi sintetizado em fase sólida pelo método proposto por Merrifield (1963). A cauda de pentaglicina presente nessa estrutura foi adicionada apenas para atuar como uma seqüência espaçadora entre a resina e os 11 resíduos de aminoácidos que definem o sítio inibitório.

O produto dessa reação de síntese foi submetido à cromatografia de fase reversa para a análise de sua pureza. Como pode ser visto na figura 12, o cromatograma demonstrou um material bastante homogêneo. Assim sendo, esse material foi submetido à análise por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray* sem

purificação prévia. A figura 13 apresenta os dados espectrométricos do peptídeo proposto, confirmando-se a massa molecular da estrutura desejada (1529,63 Da) com um grau de pureza satisfatório.



**Figura 12:** Análise cromatográfica em fase reversa do peptídeo antiqumotripsina SCTFSLPPQCYGGGGG. Identificado um pico principal. Condições cromatográficas: Coluna 250 x 4,6 mm; FE: Varian OmniSpher C18, 5  $\mu$ L; FM: A: H<sub>2</sub>O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,1%; eluição por gradiente: 0 a 100% de B em 10 minutos; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup> detecção: UV em 280 nm.



**Figura 13:** Identificação do peptídeo antiqumotripsina SCTFSLPPQCYGGGGG (pico principal da figura 12) por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*. O pico principal mostrado no espectro (764.3222) apresenta carga 2+, gerando o peptídeo proposto de massa molecular 1529,63 Da.

A atividade inibitória desse produto de síntese foi determinada pelo ensaio de inibição da quimotripsina, empregando-se L-BTpNA como substrato, como descrito no item 3.2.2.

#### 4.1.3. Absorção intestinal em segmento isolado de íleo

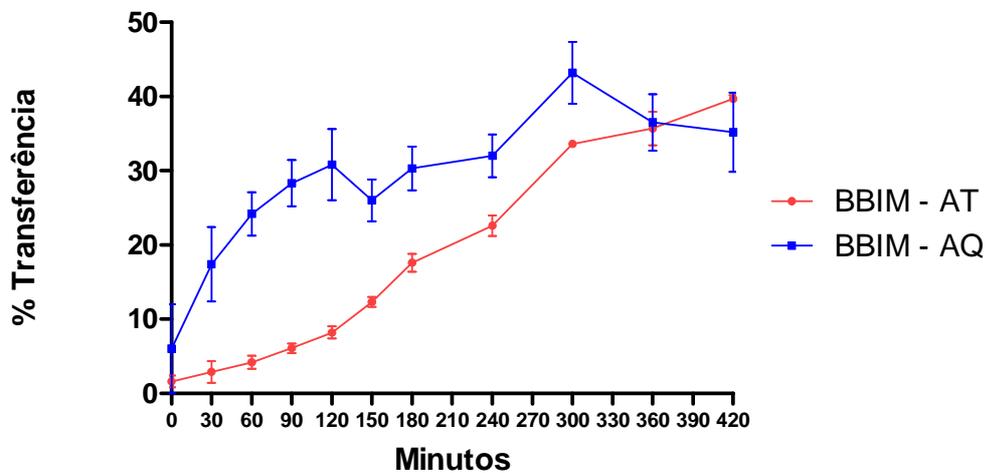
Acredita-se que estruturas menores do BBI teriam, a princípio, maior mobilidade pelo organismo, podendo apresentar maior atividade e melhor distribuição e absorção em relação à estrutura nativa do BBI. As diferenças entre as massas moleculares dos inibidores em estudo são significativas, uma vez que o BBI purificado da semente de *Macrotyloma axillare* (BBIM) possui massa molecular de 8000 Da, e os peptídeos sintéticos possuem 1225,55 Da e 1529,63 Da para as estruturas com atividades antitripsina e anti-quimotripsina, respectivamente. Portanto, os peptídeos sintéticos são, aproximadamente, seis vezes menores que a proteína nativa.

Para medir a velocidade de absorção intestinal e determinar a biodisponibilidade em segmento isolado do intestino, a transposição dos peptídeos e BBIM foi acompanhada por ensaios de inibição enzimática. Estudos prévios utilizaram BBI marcado com  $^{125}\text{I}$  para medir a biodisponibilidade desse inibidor em camundongos que receberam a proteína marcada por administração oral (Billings *et al.*, 1992). Entretanto, a possibilidade de decomposição do inibidor íntegro em fragmentos menores ou mesmo em  $^{125}\text{I}$  livre pode gerar resultados duvidosos quanto a real velocidade de transposição do inibidor inalterado.

Como pode ser visto na figura 14, o BBIM apresentou aproximadamente 40% de absorção em sete horas de experimento, tanto para a atividade antitripsina (AT) como para a atividade anti-quimotripsina (AQ). Entretanto, a cinética de absorção diferiu para as duas atividades mostrando uma absorção mais rápida de AQ, atingindo aproximadamente 30% de absorção em 120 minutos, ao passo que a AT permaneceu inferior a 10% e atingiu 30% somente com 300 minutos de ensaio. As análises estatísticas realizadas indicaram que os dados não seguem uma distribuição normal (teste de Anderson-Darling,  $p < 0,05$ ), sendo necessário a utilização do teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual constatou que as curvas se diferem

estatisticamente ( $p = 0,0026$ ), mesmo com os pontos se cruzando no tempo de 360 minutos. Essas diferenças observadas nas absorções das AT e AQ do BBIM ao longo do tempo podem ser devidas às alterações na estrutura da molécula modificando ou separando seus domínios de inibição no interior das células intestinais.

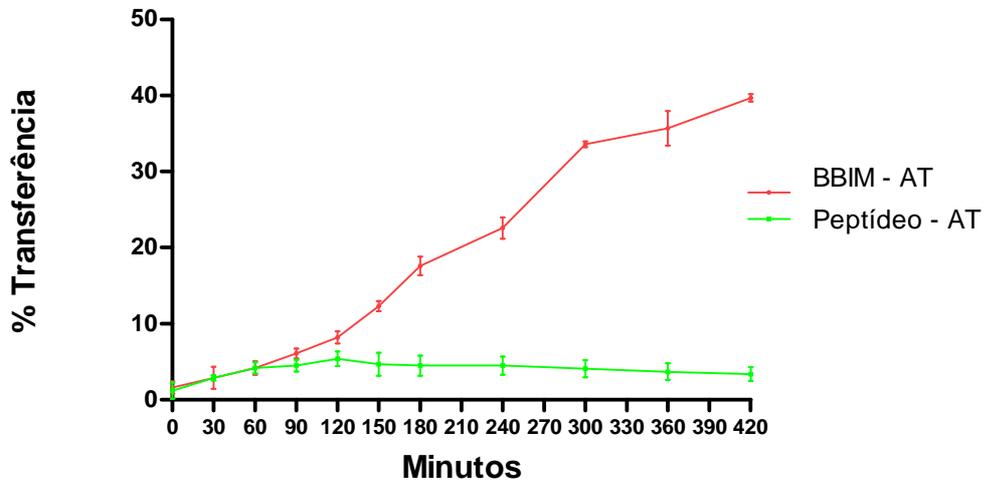
**Absorção *in vitro* do BBIM, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c**



**Figura 14: Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c.** Avaliação da % de transferência do BBIM, com ensaio específico para a atividade antitripsina (AT) e atividade antiqumotripsina (AQ). Os dados são apresentados com os erros padrões da média.

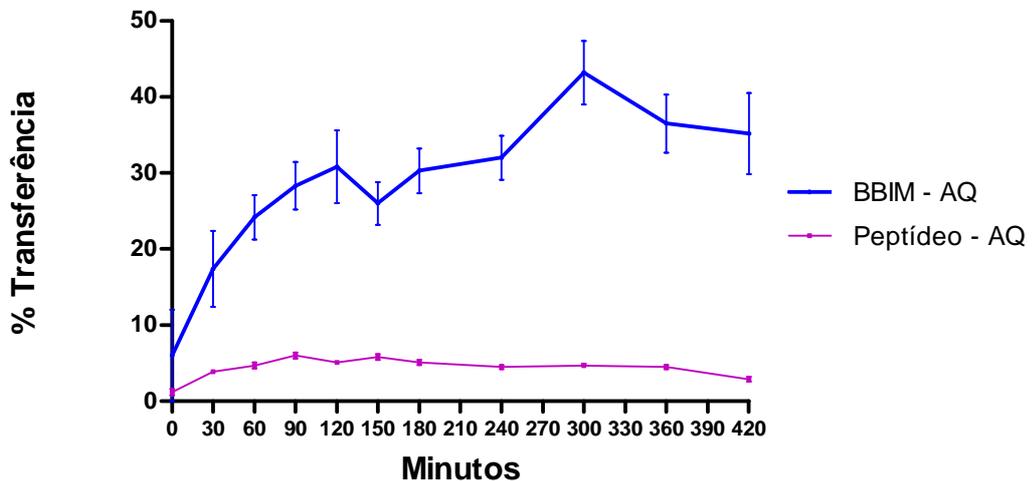
Ao se comparar as AT e AQ do BBIM com os peptídeos sintéticos, foi possível notar que os peptídeos foram significativamente menos absorvidos, mantendo uma percentagem de transferência de aproximadamente 5% durante todo o experimento (figuras 15 e 16).

**Absorção *in vitro* do BBIM e peptídeo sintético antitripsina, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c**



**Figura 15:** Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM e peptídeo sintético antitripsina, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c. Avaliação da % de transferência do BBIM nativo, com ensaio específico para a atividade antitripsina (AT) do inibidor; e do peptídeo sintético antitripsina. Os dados são apresentados com os erros padrões da média.

**Absorção *in vitro* do BBIM e peptídeo sintético antiqumotripsina, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c**



**Figura 16:** Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM e peptídeo sintético antiqumotripsina, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c. Avaliação da % de transferência do BBIM nativo, com ensaio específico para a atividade antiqumotripsina (AQ) do inibidor; e do peptídeo sintético antiqumotripsina. Os dados são apresentados com os erros padrões da média.

Visando esclarecer as razões pelas quais os peptídeos não atravessaram os segmentos intestinais, as seguintes possibilidades foram levantadas: a formação de um complexo protéico capaz de seqüestrar o peptídeo e a decomposição do peptídeo iniciada pela redução da ponte dissulfeto por enzimas intracelulares levando à inativação desse inibidor. Com relação à primeira possibilidade, tentou-se recuperar a atividade em homogenatos do intestino submetidos ao ensaio de absorção e do muco intestinal que se acumulava. Assim sendo, não foi possível recuperar qualquer atividade inibitória após filtração em gel dos homogenatos dos íleos e mucos. A tentativa de reciclagem após redução induzida das pontes dissulfeto não resultou em reaparecimento de atividade inibitória. Desta forma, considerando-se que os peptídeos permaneceram íntegros, os mecanismos pelos quais estes apresentaram baixa percentagem de transferência permanecem por serem elucidados. A marcação dos peptídeos sintéticos com radioisótopos seria uma alternativa viável para a determinação do destino desses peptídeos no ensaio de absorção intestinal. Tendo em vista as dificuldades encontradas em adquirir  $^{125}\text{I}$  radioativo, não foi possível realizar tal análise.

Os resultados encontrados para a absorção intestinal do BBIM podem ser justificados pela resistência dessa proteína à ação das enzimas digestivas (Kennedy, 1998). É importante ressaltar que a estrutura dessa molécula é bastante estável devido à presença de sete pontes dissulfeto podendo ainda apresentar-se como agregados geralmente diméricos (Sreerama & Gowda, 1998).

Trabalhos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que sementes germinadas de *Macrotyloma axillare* por 120 horas apresentaram formas de BBI com atividade inibitória aumentada em relação a serino-proteases e redução da massa molecular, para aproximadamente 6 kDa, em relação ao inibidor das sementes dormentes. As alterações na estrutura correspondem a hidrólises nas porções N e C-terminais e conversão da forma dimérica para monomérica. Os resultados mostraram uma absorção intestinal de 30% para o BBI das sementes de *M. axillare* e 40% para o BBI obtido dos cotilédones, sugerindo que as hidrólises do BBI que acontecem na semente favorecem a absorção deste inibidor.

Tais resultados nos levam a crer que estruturas menores, porém mais estáveis que os peptídeos sintéticos propostos, possam atravessar com maior facilidade a barreira intestinal. Tendo em vista a importância da obtenção de estruturas menores e mais

estáveis do BBI da semente de *M. axillare*, foi proposto a hidrólise dessa molécula com ácido fórmico, o que resultaria em uma cabeça inibitória de tripsina contendo quatro pontes dissulfeto e outra cabeça inibitória de quimotripsina contendo três pontes dissulfeto, mantendo-se assim a estabilidade das novas moléculas.

#### **4.2. Fragmentação do BBI obtido da semente de *Macrotyloma axillare***

A obtenção de estruturas menores para o inibidor HGI-III, da família *Bowman-Birk*, obtido da planta *Dolichos biflorus*, foi proposta por Sreerama & Gowda (1997). Esse inibidor, composto por 76 resíduos de aminoácidos, compartilha considerável homologia com o BBIM, pois são obtidos de plantas do mesmo gênero, possuindo as sete pontes dissulfeto conservadas e a mesma seqüência N-terminal. A digestão do HGI-III foi realizada com TPCK-tripsina, brometo cianogênico (CNBr) e lisilendoproteinase C (Lys C), para o estudo da imunogenicidade dos fragmentos. Para a obtenção dos fragmentos pela digestão com tripsina, os autores utilizaram um baixo pH de reação, com o objetivo de minimizar o efeito inibitório do BBI, preservando-se uma leve atividade enzimática, fora do pH ótimo da enzima. Essa estratégia gerou um rendimento muito baixo, possibilitando a obtenção dos fragmentos antigênicos. Assim sendo, a digestão com tripsina não seria uma boa estratégia para a obtenção de fragmentos do BBIM de forma preparativa. A literatura menciona que o tratamento do BBI da soja com CNBr clivou o inibidor em dois fragmentos ativos (Birk *et al.*, 1986). Entretanto, essas cabeças permaneceriam ligadas pelas pontes dissulfeto sem reduzir o tamanho do inibidor. Desta forma, a análise da literatura não mostrou nenhum trabalho que objetivava a obtenção de forma preparativa dos fragmentos dotados de atividade inibitória.

A fragmentação de moléculas protéicas com ácido fórmico vem sendo empregada como alternativa para a digestão de amostras de proteínas em análises proteômicas. Esse tratamento é capaz de hidrolisar proteínas na carbonila do resíduo de Asp envolvida na ligação peptídica e ocasionalmente na carbonila da ligação peptídica anterior à porção N terminal do Asp (Li *et al.*, 2001). Uma predição dos produtos de

hidrólise gerados pelo ácido fórmico para as estruturas primárias dos inibidores DE-3 e DE-4 obtidos da semente de *M. axillare* (Joubert *et al.*, 1979), demonstrou-se a possibilidade de se obter as cabeças de inibição dissociadas. Como pode ser visto na figura 17, a hidrólise com ácido fórmico levaria à obtenção das cabeças inibitórias antitripsina, contendo quatro pontes dissulfeto e das cabeças inibitórias antiquimotripsina, contendo três pontes dissulfeto. Segundo Joubert *et al.* (1979), o sítio inibitório para a tripsina compreende Lys<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup> para a isoforma DE-3 e DE-4 quando estão alinhados pela primeira cisteína e numerados a partir da mesma; enquanto que para a quimotripsina, Phe<sup>36</sup>-Ser<sup>37</sup> para DE-3 e Leu<sup>36</sup>-Ser<sup>37</sup> para DE-4 quando estão alinhados nas mesmas condições acima.

Em trabalhos recentes, Hua *et al.* (2006) desenvolveram um protocolo empregando o microondas para acelerar a hidrólise com ácido fórmico a 2% em relação ao método original por aquecimento a 108°C por duas horas. Tendo em vista os resultados satisfatórios obtidos, esse método foi utilizado para a fragmentação do BBIM. De acordo com Pramanik *et al.* (2002), o microondas doméstico pode ser utilizado para a clivagem proteolítica, pois esse aparelho pode ser programado para as mesmas potências dos equipamentos de microondas especializados.

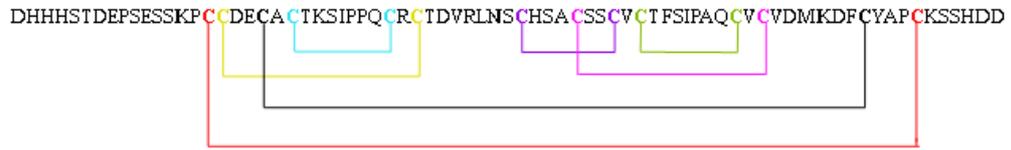
A fragmentação da molécula foi monitorada por cromatografia de exclusão molecular, utilizando resina G25 a qual permite o fracionamento de proteínas entre 1000 a 5000 Da, possibilitando a separação dos fragmentos esperados. O fracionamento foi acompanhado pelo ensaio de atividade inibitória, demonstrando que as porções ativas eram preservadas no processo.

Vários ensaios para a padronização da técnica de fragmentação do BBIM assistida por microondas utilizando-se ácido fórmico a 2% foram realizados. A dificuldade inicial foi devida à evaporação da solução contendo o inibidor e o ácido quando submetidos à irradiação microondas. Vários tempos e várias potências do equipamento (potências de 1 a 10) foram testados objetivando-se a minimização da evaporação e perda da atividade. Concomitantemente às tentativas descritas, foram realizados testes de fragmentação a 80°C em tempos longos, superiores a 12 horas. Todavia as análises das preparações não revelaram sucesso nessas tentativas de fragmentação, mas demonstrou-se que os inibidores permaneceram ativos após esses drásticos tratamentos.

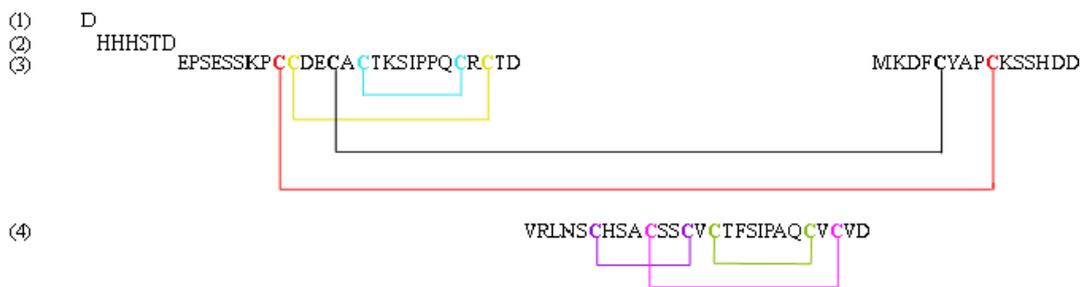
**BBIM**

**ISOFORMA DE-3**

Molécula nativa:

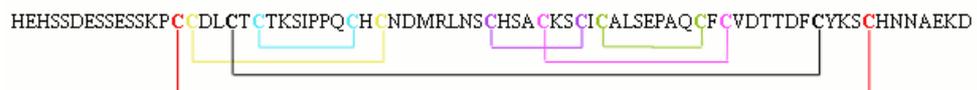


Fragmentos gerados por hidrólise com ácido fórmico:

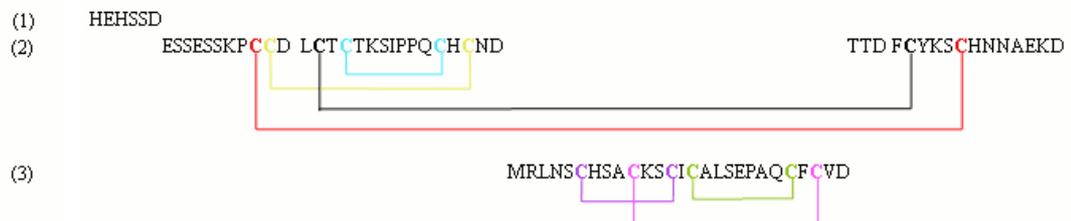


**ISOFORMA DE-4**

Molécula nativa:



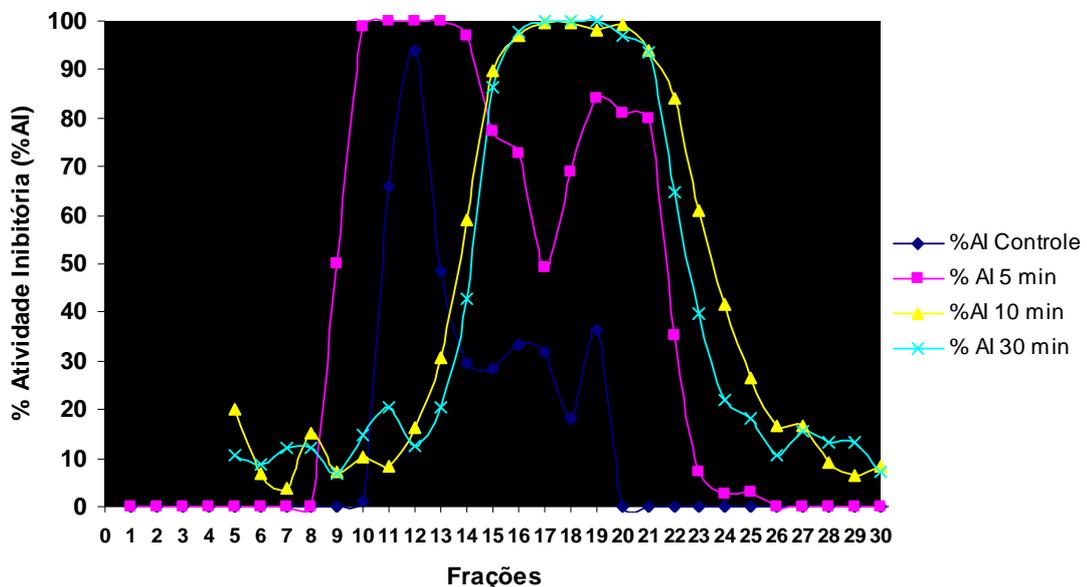
Fragmentos gerados por hidrólise com ácido fórmico:



**Figura 17: Seqüência primária das isoformas DE-3 e DE-4 segundo Joubert *et al.* (1979) e representação dos fragmentos gerados pela hidrólise com ácido fórmico.** Isoforma DE-3: (3) cabeça inibitória antitripsina e (4) cabeça inibitória antiqumotripsina. Isoforma DE-4: (2) cabeça inibitória antitripsina e (3) cabeça inibitória antiqumotripsina. As ligações C – C representam as pontes dissulfeto contidas na molécula.

Após o acoplamento de um condensador de refluxo conectado por um furo no aparelho de microondas ao balão de reação submetido à radiação, iniciou-se os tratamentos à potência de 800 W. De acordo com Hua *et al.* (2006) o tempo de hidrólise recomendado é de até 10 minutos. Entretanto, a fragmentação do BBIM somente ocorreu por completo em tempos superiores a 10 minutos como pode ser observado na figura 18.

**Percentagem de atividade inibitória do BBIM após fragmentação com ácido fórmico 2% no microondas em diferentes intervalos de tempo**



**Figura 18: Percentagem de atividade inibitória do BBIM após fragmentação com ácido fórmico 2% no microondas em diferentes intervalos de tempo.** % AI Controle, % atividade inibitória de cada fração da cromatografia da amostra não tratada. % AI 5 min, % atividade inibitória de cada fração da cromatografia da amostra tratada por 5 minutos no microondas; % AI 10 minutos, % atividade inibitória de cada fração da cromatografia da amostra tratada por 10 minutos no microondas; % AI 30 min, % atividade inibitória de cada fração da cromatografia da amostra tratada por 30 minutos no microondas.

O perfil cromatográfico mostra claramente que as frações que caracterizam o pico do inibidor íntegro (frações 10 a 13 do experimento controle) foram acompanhadas pela atividade inibitória da tripsina, indicando que o inibidor encontra-se nessas frações. As amostras que foram tratadas com ácido fórmico 2% em diferentes intervalos de

tempo mostram um perfil diferente do controle, com o pico do inibidor deslocado para as frações 15 a 21, sendo também acompanhado pelo ensaio de atividade, indicando que a atividade inibitória sobre a tripsina foi preservada. Tempos de tratamento superiores a 10 min (30, 60, 120 min) mostraram perfis idênticos, indicando que esse tempo corresponde à hidrólise máxima do inibidor com esse tratamento. Entretanto, em alguns experimentos, notou-se uma fração residual de inibidor íntegro sugerindo que o tempo de 10 minutos é limítrofe para esse procedimento. Portanto o tempo de hidrólise considerado ideal foi de 30 minutos. Ensaio de atividade inibitória para quimotripsina foram realizados demonstrando que o inibidor fragmentado também apresentava essa atividade totalmente preservada.

Os produtos das reações de fragmentação com ácido fórmico 2% por 30 minutos foram submetidos à análise por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*. Os resultados demonstram claramente a presença das massas dos fragmentos esperadas para o inibidor DE-3 e DE-4 como apresentados na tabela 2.

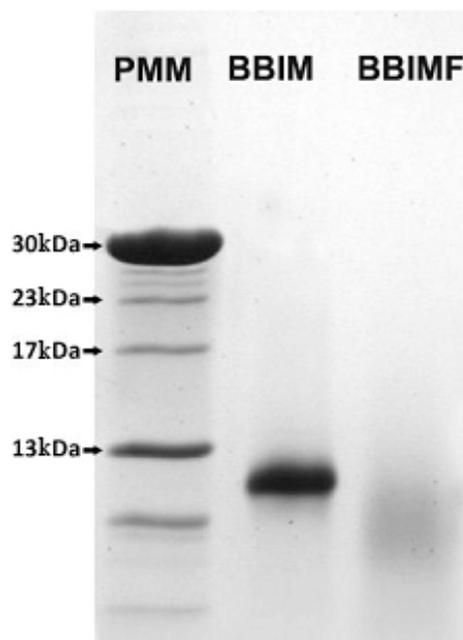
**Tabela 2: Identificação por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray* dos fragmentos obtidos pela hidrólise ácida do BBIM no microondas por 30 minutos.**

Fragmentos	Massa predita do fragmento [M+H] <sup>+</sup>	Íon obtido da espectrometria de massa [M+H] <sup>+</sup>	Formilações e hidrólises entre pontes dissulfeto [M+H] <sup>+</sup>
<b>DE-3</b>			
(I) HHHSTD	733,3019	789,433	789,2901 *
(II) Cabeça antiqumotripsina VRLNSCHSACSSCVCTFSIPAQCVCVD	2826,1591	2826,1497	2826,1591
(III) Cabeça antitripsina EPSESSKPCDECACTKSIPPQCRCTDM KDFCYAPCKSSHD	4521,7439	4690,0385 4717,7242	4690,8158 ***** 4717,7026 ***
(IV) Cabeça antitripsina EPSESSKPCDECACTKSIPPQCRCTDM KDFCYAPCKSSHD	4537,7388 <sup>◇</sup>	4667,9680	4667,7302 **
<b>DE-4</b>			
(V) HEHSSD	711,2700	757,4619	757,2791 ****
(VI) Cabeça antiqumotripsina MRLNSCHSACKSCICALSEPAQCFCVD	2913,1734	2913,1578	2913,1734

\* 2 formilações; \*\* 4 formilações e adição de 1 H<sub>2</sub>O; \*\*\* 7 formilações; \*\*\*\*\* 1 formilação e adição de 1 H<sub>2</sub>O; \*\*\*\*\* Adição de 3 H<sub>2</sub>O; <sup>◇</sup> cálculo realizado considerando oxidação de metionina. Massa molecular em Da.

A possibilidade de formilação nos resíduos de lisina, serina, treonina e no N-terminal das moléculas fragmentadas foi considerada. Assim sendo, os fragmentos (I), (III), (IV) e (V) foram identificados considerando adição das massas correspondentes a essas modificações. Os fragmentos (III), (IV) e (V) foram identificados como esperados, considerando-se além das possibilidades de formilações, hidrólises e adição de moléculas de água (MM= 18,015 Da) no fragmento. Por outro lado, os fragmentos (II) e (VI) correspondentes às cabeças inibitórias de quimotripsina, foram identificados com a estrutura esperada sem hidrólises internas às pontes de dissulfeto ou formilações. Os dados da espectrometria de massa confirmaram a fragmentação do BBIM, resultando nas cabeças inibitórias antitripsina e anti-quimotripsina dissociadas.

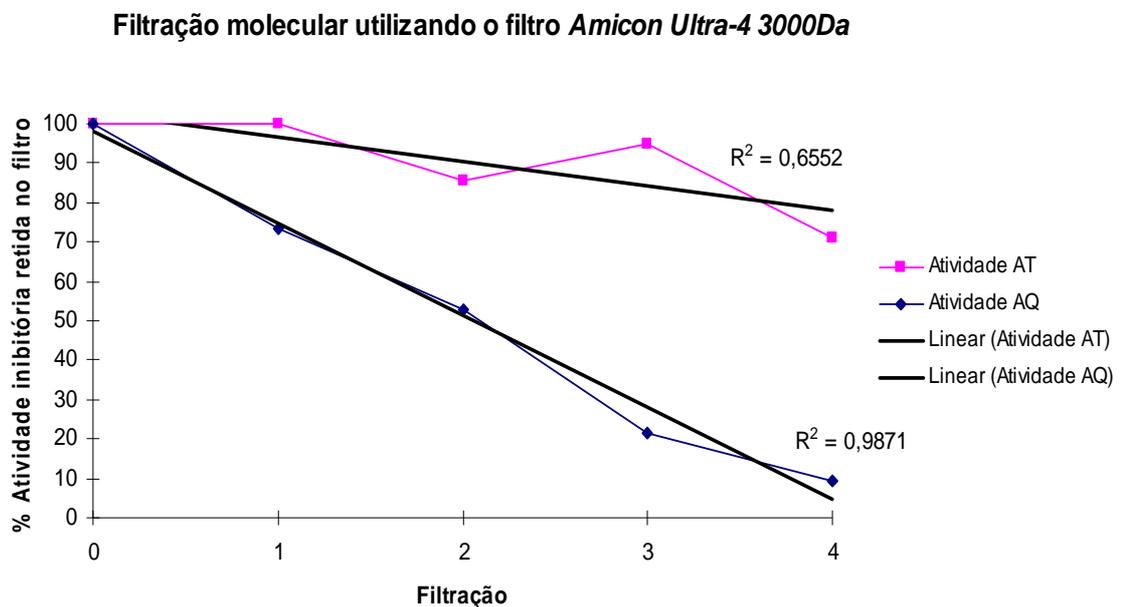
A fragmentação do BBIM também foi monitorada por eletroforese em SDS-PAGE como pode ser observado na figura abaixo. Este resultado mostrou que o BBIM foi, praticamente, todo reduzido a moléculas de tamanhos menores (figura 19).



**Figura 19: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 15% SDS-PAGE do BBIM e do BBIM fragmentado (BBIMF).** Padrão de massa molecular (PMM) de ConA. Gel corado por *comassie blue*.

Com o objetivo separar e caracterizar as cabeças de inibição fragmentadas, a amostra tratada com ácido fórmico foi submetida à filtração molecular. O filtro *Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 3000 Da* foi escolhido pois permitiria a filtração da cabeça

antiquimotripsina e a retenção da cabeça antitripsina (MM = 4500Da aproximadamente). Entretanto, as cabeças com AQ com massas moleculares de 2826,1591Da e 2913,1734Da foram retidas nos poros do filtro, dada a proximidade dessas massas moleculares em comparação com as dimensões dos poros da membrana de filtração. No entanto, esse procedimento proporcionou uma evidência contundente da separação das duas cabeças, de forma quantitativa, quanto a extensão dessa fragmentação. Além disso, permitiu a obtenção de uma fração contendo a cabeça com AT, aproximadamente, 95% isolada da cabeça com AQ.



**Figura 20: Separação das cabeças obtidas do BBIM a partir da utilização do filtro *Amicon Ultra-4 3000 Da*.** Atividade AT, atividade antitripsina da molécula fragmentada; Atividade AQ, atividade antiquimotripsina da molécula fragmentada; Linear, regressão linear.

Para caracterizar os inibidores utilizados nesse trabalho quanto à capacidade de inibição, determinou-se as atividades específicas e  $IC_{50}$  dos diferentes inibidores. Conforme demonstrado na tabela 3, observa-se que as formas de inibidores utilizadas não diferem substancialmente nas suas AT e AQ.

Tabela 3: Comparação das atividades específicas e IC<sub>50</sub> das diferentes formas do inibidor BBIM

Formas do inibidor	Massa Molecular (MM)	Atividade específica AT	Atividade específica AQ	IC <sub>50</sub> AT	IC <sub>50</sub> AQ
<b>BBIM</b>	8000	17754	2438	$2,6 \times 10^{-8}$	$2,1 \times 10^{-7}$
<b>BBIM fragmentado*</b>	4528,8**	30171	-	$4,0 \times 10^{-8}$	-
	2826,2***	-	12182	-	$1,3 \times 10^{-7}$
<b>Peptídeo antitripsina</b>	1225,55	101310	-	$3,1 \times 10^{-8}$	-
<b>Peptídeo antiqumotripsina</b>	1529,63	-	21320	-	$2,9 \times 10^{-7}$

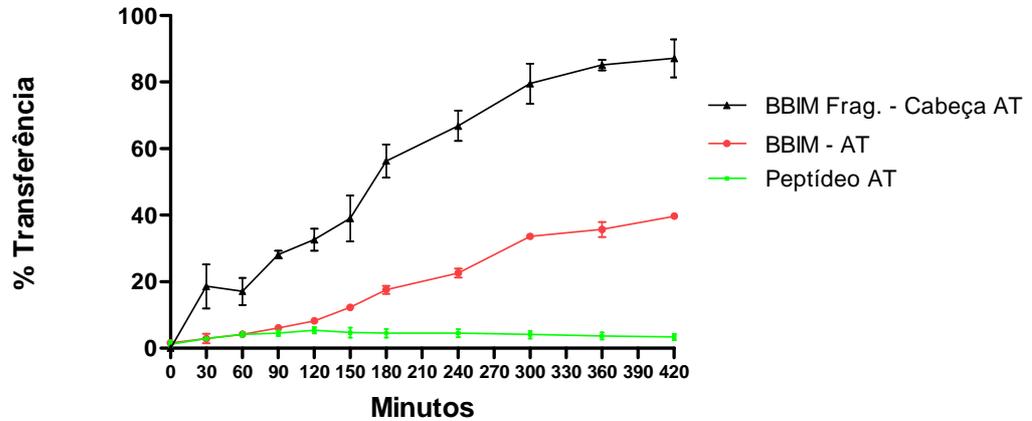
\* Os cálculos foram realizados para o inibidor DE-3. \*\* Cabeça antitripsina do BBIM fragmentado. \*\*\* Cabeça antiqumotripsina do BBIM fragmentado. AT, atividade antitripsina; AQ, atividade antiqumotripsina. Massa molecular em Da.

#### 4.2.1 Absorção intestinal dos fragmentos obtidos por hidrólise ácida em segmento de íleo isolado

Com o objetivo de avaliar o benefício da redução de tamanho na biodisponibilidade dos domínios ativos da molécula de BBIM, foram realizados experimentos com segmentos de íleo de camundongos observando-se a velocidade de transposição de inibidores adicionados no interior do intestino para o líquido fisiológico externo. A figura 21 mostra que a absorção para a cabeça com AT do BBIM fragmentado apresenta maior percentagem de absorção (87 %) em relação a molécula de BBIM íntegra, à qual apresenta apenas 40 % de absorção decorridos 420 minutos do experimento. As curvas de absorção apresentam-se praticamente paralelas indicando que as velocidades de absorção das diferentes formas de inibidores podem ser semelhantes. O peptídeo sintético mostrado no mesmo gráfico ilustra, como citado anteriormente, a ausência de atividade transferida nesse ensaio.

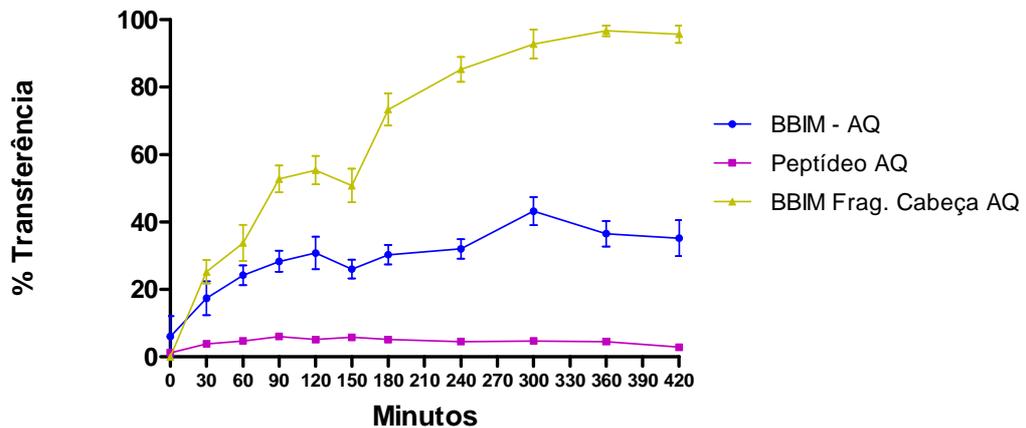
Os experimentos de absorção intestinal do fragmento com AQ mostram comportamento semelhante ao descrito para o fragmento com AT, demonstrando que a redução de tamanho da molécula de BBIM proporcionou um ganho significativo no percentual absorvido desses dois domínios ativos (figura 22).

**Absorção *in vitro* do BBIM, peptídeo sintético antitripsina e BBIM fragmentado, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c**



**Figura 21: Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM, peptídeo sintético antitripsina e BBIM fragmentado, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c.** Avaliação da % de transferência do BBIM nativo, com ensaio específico para a atividade antitripsina (AT) do inibidor; do peptídeo sintético antitripsina e do BBIM fragmentado com ensaio específico para a cabeça com atividade antitripsina (AT). Os dados são apresentados com os erros padrões da média.

**Absorção *in vitro* do BBIM, peptídeo sintético antiqumotripsina e BBIM fragmentado, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c**

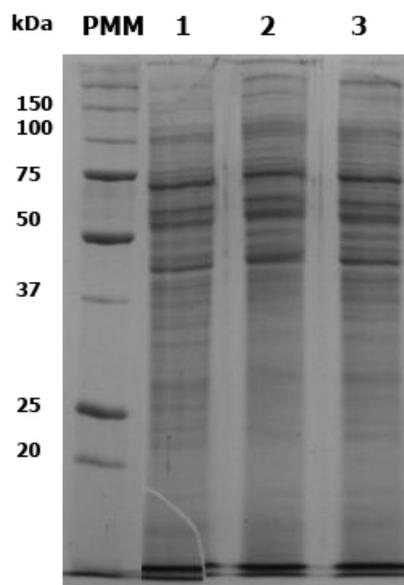


**Figura 22: Ensaio de absorção *in vitro* do BBIM, peptídeo sintético antiqumotripsina e BBIM fragmentado, em função do tempo, em íleos isolados de camundongos BALB/c.** Avaliação da % de transferência do BBIM nativo, com ensaio específico para a atividade antiqumotripsina (AQ) do inibidor; do peptídeo sintético antiqumotripsina e do BBIM fragmentado com ensaio específico para a cabeça com atividade antiqumotripsina (AQ). Os dados são apresentados com os erros padrões da média.

A redução do tamanho de moléculas protéicas constitui uma estratégia que é frequentemente citada nos trabalhos de tecnologia farmacêutica. Do ponto de vista farmacológico, a melhor distribuição do fármaco para atingir alvos de ação situados nos diversos tecidos do organismo pode ser vantajosa. Neste sentido, a proposta de obtenção de moléculas menores e mais estáveis com objetivo de melhor absorção pelo intestino foi atingida, mostrando uma biodisponibilidade 2,5 vezes maior do que aquela observada para o inibidor intacto.

### 4.3. Influência das diferentes formas de inibidores sobre a atividade do proteassoma

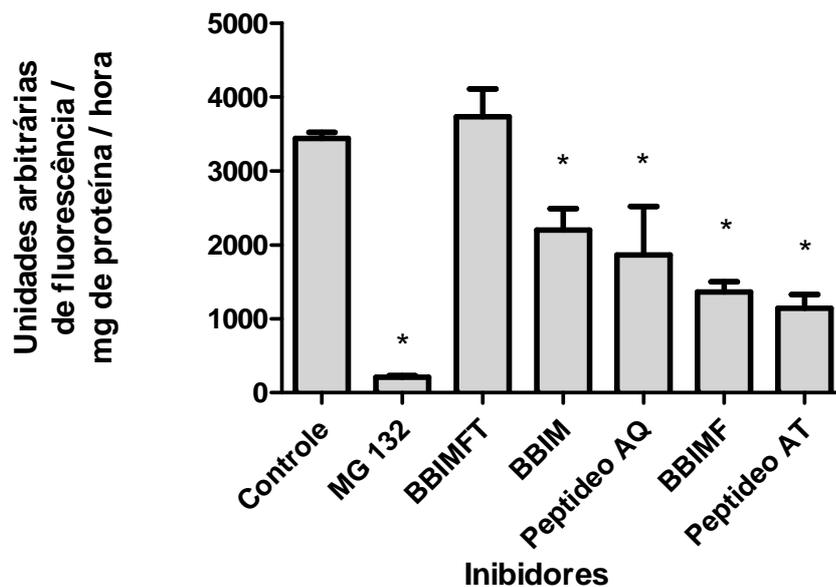
Com o intuito de avaliarmos a influência das diferentes formas de inibidores sobre as atividades peptidásicas do proteassoma 20S, as porções solúveis de homogenatos de íleos de três camundongos foram obtidas e utilizadas nos ensaios. A figura abaixo ilustra a integridade e homogeneidade das preparações através do perfil eletroforético em gel SDS-PAGE.



**Figura 23:** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12 % SDS-PAGE das três preparações de íleo ( 1, 2 e 3) de camundongos utilizadas nos ensaios de atividades peptidásicas do proteassoma. Gel corado por *comassie blue*; PMM, padrão de massa molecular *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad).

Ao analisarmos a atividade quimotripsina-símile do proteassoma na presença das diferentes formas do BBI, podemos notar que essa atividade foi inibida por quase todas as formas, exceto pela cabeça antitripsina do BBIM fragmentado, como pode ser visto na figura 24. Por outro lado, e de maneira inesperada, o peptídeo antitripsina inibiu significativamente a atividade quimotripsina-símile do proteassoma. Os resultados obtidos mostram um comportamento semelhante das formas reduzidas e da proteína nativa para a atividade quimotripsina-símile, sugerindo que essas preparações possam ter as mesmas qualidades antitumorais que a molécula íntegra, mas apresentando vantagens farmacocinéticas, como foi mostrado anteriormente. O inibidor clássico dessa atividade proteolítica, MG132, foi utilizado neste experimento para demonstrar que a maior parte de atividade peptidásica observada é proteassoma dependente.

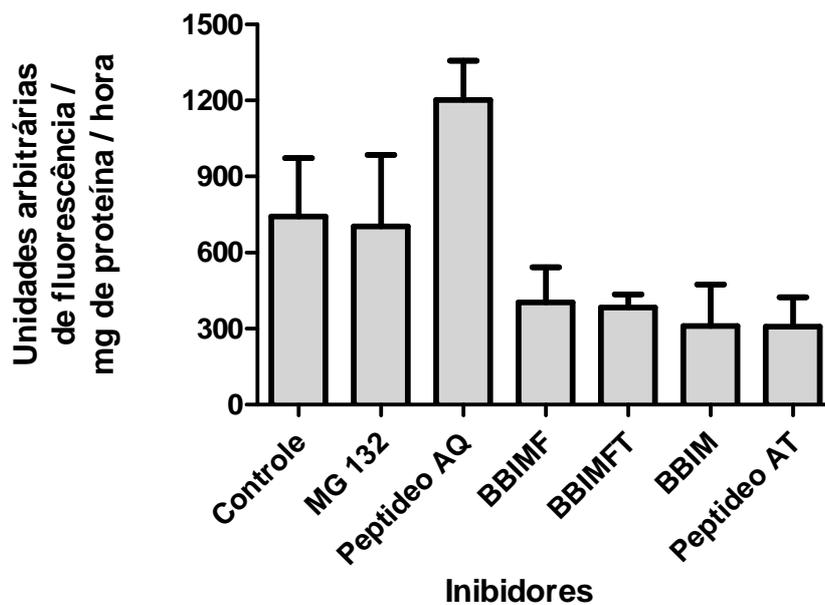
#### Atividade quimotripsina-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores



**Figura 24:** Atividade quimotripsina-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato citosólico de fígado de camundongos BALB/c. Controle, ausência de inibidor; MG132, inibidor específico da atividade quimotripsina-símile do proteassoma (N-carbobenzoxi-leucinil-leucinil-leucinal), BBIMFT, inibidor correspondente à cabeça antitripsina do BBIMF; BBIM, inibidor íntegro; Peptídeo AQ, peptídeo sintético com atividade anti-quimotripsina; BBIMF, inibidor BBIM fragmentado; Peptídeo AT, peptídeo sintético com atividade antitripsina. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os resultados dos experimentos representativos são mostrados como médias. As barras representam os erros padrões das médias. \* indicam valores significativamente diferentes do controle, com  $p \leq 0,05$ .

Ao avaliarmos a atividade tripsina-símile do proteassoma, encontramos que nenhuma forma do inibidor atua sobre essa atividade (figura 25). Esse dado difere dos resultados de Chen *et al.* (2005), que encontraram aproximadamente 25% de inibição dessa atividade.

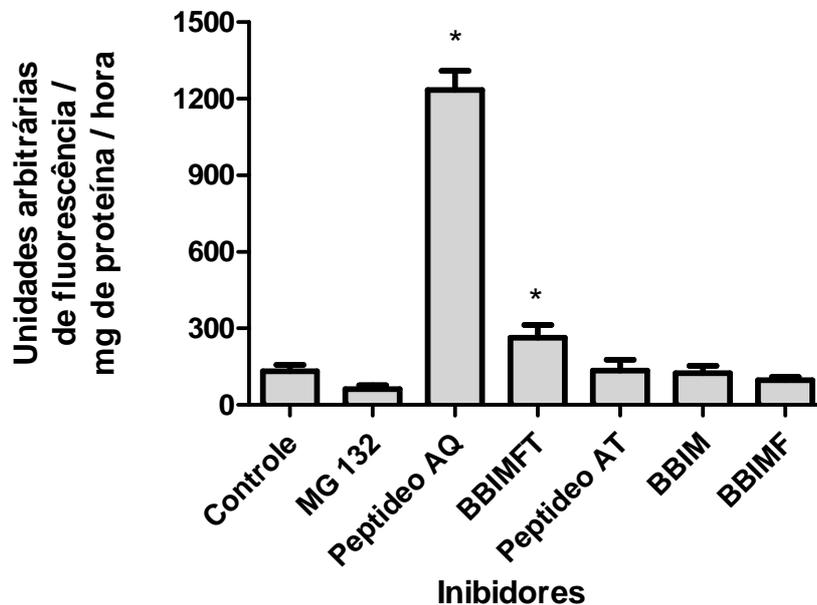
### Atividade tripsina-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores



**Figura 25: Atividade tripsina-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato citosólico de fígado de camundongos BALB/c.** Controle, ausência de inibidor; MG132, inibidor específico da atividade quimotripsina-símile do proteassoma (N-carbobenzoxi-leucinil-leucinil-leucinal), Peptídeo AQ, peptídeo sintético com atividade anti-quimotripsina; BBIMF, inibidor BBIM fragmentado; BBIMFT, inibidor correspondente à cabeça antitripsina do BBIMF; BBIM, inibidor íntegro; Peptídeo AT, peptídeo sintético com atividade antitripsina. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os resultados dos experimentos representativos são mostrados como médias. As barras representam os erros padrões da média. Não foram observados valores significativamente diferentes do controle, com  $p \leq 0,05$ .

Para a atividade caspase-símile, podemos observar na figura 26 que o BBI foi capaz de ativar essa atividade com duas formas do inibidor. O peptídeo anti-quimotripsina ativou em aproximadamente 10 vezes e a cabeça antitripsina do BBIM fragmentado ativou aproximadamente duas vezes. Estudos da literatura avaliando a influência do BBI íntegro nas atividades peptidásicas do proteassoma não mostraram esse tipo de comportamento para a atividade caspase-símile (Chen *et al.*, 2005).

### Atividade caspase-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores



**Figura 26: Atividade caspase-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato citosólico de fígado de camundongos BALB/c.** Controle, ausência de inibidor; MG132, inibidor específico da atividade quimotripsina-símile do proteassoma (N-carbobenzoxileucinil-leucinil-leucinal), caracterizado por inibir parcialmente a atividade caspase-símile do proteassoma; Peptídeo AQ, peptídeo sintético com atividade anti-quimotripsina; BBIMFT, inibidor correspondente à cabeça antitripsina do BBIMF; Peptídeo AT, peptídeo sintético com atividade antitripsina; BBIM, inibidor íntegro; BBIMF, inibidor BBIM fragmentado. Os ensaios foram realizados em triplicatas, e os resultados dos experimentos representativos são mostrados como médias. As barras representam os erros padrões da média. \* indicam valores significativamente diferentes do controle, com  $p \leq 0,05$ .

Até o momento poucos trabalhos demonstraram a utilização do BBI como um potencial inibidor das atividades do proteassoma. Estudos realizados por Saito *et al.* (2007) também encontraram inibição da atividade quimotripsina-símile na presença de BBI em células de osteossarcoma a qual foi correlacionada com a restauração dos níveis de conexina 43 intracelular. Esta última desempenha papel chave no controle homeostático celular via junções do tipo GAP. Por outro lado, vários estudos têm demonstrado a importância da via proteolítica dependente de ubiquitina e proteassoma no desenvolvimento de patologias diversas associadas ao intestino (Afjehi-Sadat *et al.*, 2004; Hoeller & Dikic, 2009; Miyagi *et al.*, 2003; Rho *et al.*, 2008). A análise proteômica do colo retal humano revelou aumento significativo de expressão da

subunidade  $\beta 7$  do proteassoma, demonstrando a importância deste complexo proteolítico no desenvolvimento do tumor (Rho *et al.*, 2008).

O presente estudo mostrou que a fragmentação do BBI íntegro com ácido fórmico não alterou a capacidade da cabeça de inibição anti-quimotripsina de modular a atividade quimotripsina-símil do proteassoma. Este resultado associado à maior absorção desta cabeça de inibição nos experimentos de biodisponibilidade torna-se interessante quando se considera a utilização de inibidores BBI na terapêutica do câncer. Apesar de ter sido observada ativação da atividade caspase-símil com duas formas derivadas do BBI, nós acreditamos que este efeito possa não comprometer sua ação antitumoral ao nível celular, haja vista que neste modelo experimental, a atividade quimotripsina-símil é a predominante.

Estudos posteriores visando determinar as atividades antitumorais dessas preparações e sobre a atividade endógena do proteassoma, auxiliarão na compreensão de mecanismos relacionados ao desenvolvimento do câncer.

## *5. Conclusões*

## 5. CONCLUSÕES

- O peptídeo correspondente ao *loop* antitripsina do BBI foi sintetizado com sucesso segundo Gariani *et al.* (1999), purificado em sistema de cromatografia de fase reversa e cromatografia de troca iônica em *Q-sepharose* e identificado por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*;
- O peptídeo correspondente ao *loop* antiquimotripsina do BBI foi sintetizado com sucesso segundo McBride *et al.* (1996), purificado em sistema de cromatografia de fase reversa e identificado por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*;
- O BBIM foi fragmentado com ácido fórmico 2% no microondas, obtendo-se de forma preparativa as duas cabeças do inibidor dissociadas e com atividades inibitórias preservadas. Os fragmentos foram identificados por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*, confirmando que a fragmentação do inibidor foi realizada com sucesso;
- A biodisponibilidade das formas reduzidas do inibidor (peptídeos sintéticos e fragmentos) foi comparada com a forma nativa do BBI em segmento isolado de fígado de camundongo. Os resultados desse trabalho mostraram que os peptídeos sintéticos não representam uma boa alternativa para o aumento de biodisponibilidade, tendo em vista a instabilidade do mesmo. Por outro lado, os fragmentos obtidos por hidrólise ácida do BBI mostraram biodisponibilidade 2.5 vezes maior do que aquela observada para o inibidor intacto, atingindo valores próximos a 100%.
- As atividades quimotripsina-símile, tripsina-símile e caspase-símile do proteossoma 20S em extrato citosólico de fígado na presença do inibidor nativo e das formas reduzidas do BBI foram avaliadas. O perfil de atividade sobre o proteossoma mostrou um comportamento das formas reduzidas semelhante à molécula nativa, especialmente para a atividade quimotripsina-símile, sugerindo que essas preparações possam ter as mesmas qualidades antitumorais que a molécula íntegra, mas apresentando vantagens farmacocinéticas. Entretanto, o peptídeo sintético antiquimotripsina e a cabeça de inibição antitripsina do BBIM fragmentado produziram notáveis aumentos na atividade caspase-símile.

## *6. Perspectivas*

## **6. PERSPECTIVAS**

Esse trabalho apresenta como perspectiva a possibilidade de utilização das formas fragmentadas de BBIM em estudos farmacocinéticos completos e em culturas de células tumorais. Estudos posteriores visando estabilizar os peptídeos sintéticos poderão gerar novos compostos ativos contra o câncer, através da obtenção de estruturas ainda menores que os fragmentos obtidos por hidrólise ácida. Além disso, outros trabalhos visando explorar de forma mais detalhada a ação destes inibidores sobre a atividade do proteassoma, serão úteis para o entendimento de mecanismos relacionados ao desenvolvimento tumoral.

## *7. Referências Bibliográficas*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFJEHI-SADAT L., GRUBER-OLIPITZ M., FELIZARDO M., SLAVE I. & LUBEC G. (2004) Expression of proteasomal proteins in ten different tumor cell lines. *Amino Acids* **27**, 129-140.
- ALBERICIO.F. & CARPINO L.A. (1997) Solid phase peptide synthesis. *Methods in Enzimology* **289**, 104-126.
- AMERIK A.Y. & HOCHSTRASSER M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes, *Biochim. Biophys. Biochimica et Biophysica Acta* **1695**, 189-207.
- ANBANANDAM A., ALBARADO D.C., TIRZIU D.C., SIMONS M. & VEERARAGHAVAN S. (2008) Molecular basis for proline- and arginine-rich peptide inhibitor of proteasome. *J.Mol.Biol.* **384**, 219-227.
- BARK S.J., MUSTER N., YATES J.R. & SIUZDAK G. (2001) High-temperature protein mass mapping using a thermophilic protease. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 1774-1775.
- BETTER PASTURES FOR THE TROPICS AND SUBTROPICS. *Macrotyloma axillare* – <http://tropicalgrasslands.asn.au/pastures/axillr.htm>. 2003. (Sítio da Internet).
- BILLINGS P.C., NEWBERNE P.M. & KENNEDY A.R. (1990) Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* **11**, 1083-1086.
- BILLINGS P.C., BRANDON D.L. & HABRES J.M. (1991) Internalization of the Bowman-Birk protease inhibitor by intestinal epithelial cells. *Eur.J.Cancer* **27**, 903-908.
- BILLINGS P.C., ST.CLAIR W.H., MAKI P.A. & KENNEDY A.R. (1992) Distribution of the Bowman-Birk protease inhibitor in mice following oral administration. *Cancer Letters* **62**, 191-197.
- BIRK Y. (1961) Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and chymotrypsin from soybeans. *Biochim.Biophys.Acta* **54**, 378-381.
- BIRK Y., SMIRNOFF.P & RAMACHANDRAN J. (1986) Photoreactive, active derivatives of trypsin and chymotrypsin inhibitors from soybeans and chickpeas. *Adv.Exp.Med.Biol.* **199**, 469-481.
- BOWMAN D.E. (1946) Differentiation of soybean antitryptic factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **63**, 547-550.

- CAVO M. (2006) Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* **20**, 1341-1352.
- CHANG J.D., LI J.H., BILLINGS P.C. & KENNEDY A.R. (1990) Effects of protease inhibitors on c-myc expression in normal and transformed C3H10T1/2 cell lines. *Mol.Carcinog.* **3**, 226-232.
- CHEN P., ROSE J., LOVE R., WEI C.H. & WANG B.C. (1992) Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk Protease inhibitor are similar to other trypsin inhibitions. *J.Mol.Biol.* **267**, 1990-1994.
- CHEN Y.-W., HUANG S.-C., LIN-SHIAU S.-Y. & LIN J.-K. (2005) Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* **26**, 1296-1306.
- DAUGHERTY A.L. & MRSNY R.J. (1999) Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *PSTT* **2**, 281-287.
- ELSASSER S. & FINLEY D. (2005) Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nature Cell Biology* **7**, 742-749.
- EVANS S.M., SZUHAJ B.F., VAN WINKLE T., MICHEL K. & KENNEDY A.R. (1992) Protection against metastasis of radiation induced thymic lymphosarcoma and weight loss in C57Bl / 6NCr1Br mice by an autoclave resistant factor present in soybeans. *Radiat.Res.* **132**, 259-262.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/gallery/pictures/macaxi.jpg](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/gallery/pictures/macaxi.jpg) . 2003. (Sítio da *Internet*).
- FERNANDEZ J.H., MELLO M.O., GALGARO L., TANAKA A.S., SILVA-FILHO M.C. & NESHICH G. (2007) Proteinase inhibition using small Bowman-Birk-type structures. *Genetics and Molecular Research* **6**, 846-858.
- FRIEDMAN M., GUMBMANN M.R. & GROSJEAN O.K. (1984) Nutritional improvement of soy flour. *Journal of Nutrition* **114**, 2241-2246.
- GARIANI T., MCBRIDE J.D. & LEATHERBARROW R.J. (1999) The role of the P<sub>2</sub>' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin. Studies on P<sub>2</sub>' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. *Biochimica et Biophysica Acta* **1431**, 232-237.
- HANNA J. & FINLEY D. (2007) A proteasome for all occasions. *FEBS Lett.* **53**,
- HARRISON G., WEED R.B., MCGANDY & KENNEDY A.R. (1985) Protection against dimethylhydrazine-induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* **6**, 1239-1241.
- HOELLER D. & DIKIC I. (2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* **458**, 438-444.

- HUA L., LOW T.Y. & SZE S.K. (2006) Microwave-assisted specific chemical digestion for rapid protein identification. *Proteomics* **6**, 586-591.
- INGLIS A.S. (1983) Cleavage at aspartic acid. *Methods Enzymol.* **91**, 324-332.
- JENSEN B., UNGER K.K., UEBE J., GEY M., KIM Y.M. & FLECKER P. (1996) Proteolytic cleavage of soybean Bowman-Birk inhibitor monitored by means of high-performance capillary electrophoresis. Implications for the mechanism of proteinase inhibitors. *J.Biochem.Biophys.Methods* **33**, 171-185.
- JOUBERT F.J., KRUGER H., TOWNSHEND G.S. & BOTES D.P. (1979) Purification, Some Properties and the Complete Primary Structures of Two Protease Inhibitors (DE-3 and DE-4) from *Macrotyloma-Axillare* Seed. *European Journal of Biochemistry* **97**, 85-91.
- KENNEDY A.R. (1994) Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. *Cancer Res.* **54**, 1999-2005.
- KENNEDY A.R. (1998) Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther* **78**, 167-209.
- KISSELEV A.F., CALLARD A. & GOLDBERG A.L. (2006) Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 8582-8590.
- KUMAR, P., SWEERAMA, Y.N., GOWDA, L.R. (2002) Formation of Bowman-Birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichos biflorus*). *Phytochemistry* **60**, 581-588.
- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-681.
- LARHED M. & HALLBERG A. (2001) Microwave-Assisted High-Speed Chemistry: A New Technique in Drug Discovery. *Drug Discov.Today* **6**, 406-416.
- LARIONOVA N.J., GLADYSHEVA I.P., TIKHONOVA T.V. & KAZANSKAYA N.F. (1993) Inhibition of cathepsin G and elastase from human granulocytes by multiple forms of Bowman-Birk type of soy inhibitor. *Biochemistry* **58**, 1437-1444.
- LI A., SOWDER I.R.C., HENDERSON L.E., MOORE S.P., GARFINKEL D.J. & FISHER R.J. (2001) Chemical Cleavage at Aspartyl Residues for Protein Identification. *Anal.Chem.* **73**, 5395-5402.
- LIN G., BODE W., HUBER R., CHI C. & ENGH R.A. (1993) The 0,25-nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. *Eur.J.Biochem.* **212**, 549-555.
- LIN S.-S., WU C.-H., SUN M.-C., SUN C.-M. & HO Y.-P. (2005) Microwave-assisted enzyme-catalyzed reactions in various solvent systems. *American Society for Mass Spectrometry* **16**, 581-588.

- LOSSO J.N. (2008) The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk Inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48**, 94-118.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.
- MAEDER D.L., SUNDE M. & BOTES D.P. (1992) Design and inhibitory properties of synthetic Bowman-Birk loops. *Int.J.Pept.Protein Res.* **40**, 97-102.
- MCBRIDE J.D., FREEMAN N., DOMINGO G.J. & LEATHERBARROW R.J. (1996) Selection of Chymotrypsin Inhibitors from a Conformationally-constrained Combinatorial Peptide Library. *J.Mol.Biol.* **259**, 819-827.
- MCBRIDE J.D., BRAUER A.B.E., NIEVO M. & LEATHERBARROW R.J. (1998) The Role of Threonine in the P<sub>2</sub> Position of Bowman-Birk Proteinase Inhibitors: Studies on P<sub>2</sub> Variation in Cyclic Peptides Encompassing the Reactive Site Loop. *J.Mol.Biol.* **282**, 447-457.
- MCBRIDE J.D., WATSON E.M., BRAUER A.B.E., JAULENT A.M. & LEATHERBARROW R.J. (2002) Peptide Mimics of the Bowman-Birk Inhibitor Reactive Site Loop. *Biopolymers* **66**, 79-92.
- MERRIFIELD R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J.Am.Chem.Soc.* **85**, 2149-2154.
- MIYAGI T., TATSUMI T., TAKEHARA T., KANTO T., KUZUSHITA N., SUGIMOTO Y., JINUSHI M., KASAHARA A., SASAKI Y., HORI M. & HAYASHI N. (2003) Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J.Gastroenterol.Hepatol.* **18**, 32-40.
- MORHY L. & VENTURA M.M. (1987) The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An.Acad.bras.* **59**, 71-81.
- NISHINO N., AOYAGI H., KATO T. & IZUMIYA N. (1977) Studies on the synthesis of proteinase inhibitors. *J.Biochem.(Tokyo)* **82**, 901-909.
- NORIOKA S., OMICHI K. & IKENAKA T.J. (1982) Purification and characterization of protease inhibitors from peanuts (*Arachis hypogaea*). *J.Biochem.(Tokyo)* **991**, 1427-1434.
- NORIOKA S. & IKENAKA T. (1983) Amino acid sequences of trypsin-chymotrypsin inhibitors (A-I, A-Ii, B-I, and B-Ii) from peanut (*Arachis-Hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. *Journal of Biochemistry* **94**, 589-599.
- OBARA T. & WATANABE Y. (1971) Heterogeneity of Soybean Trypsin Inhibitors. II. Heat Inactivation. *Cereal Chemistry* **48**, 523-527.

- ODANI S., KOIDE T. & ONO T. (1986) Wheat-Germ Trypsin-Inhibitors - Isolation and Structural Characterization of Single-Headed and Double-Headed Inhibitors of the Bowman-Birk Type. *Journal of Biochemistry* **100**, 975-983.
- OSMAN M.A., REID P.M. & WEBER C.W. (2002) Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. *Food Chemistry* **78**, 419-423.
- PHELAN M., AHERNE-BRUCE S.A., O'SULLIVAN D., FITZGERALD R.J. & O'BRIEN N.M. (2009) Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *International Dairy Journal* **19**, 279-285.
- PRAKASH B., SELVARAJ S., MURTHY M.R.N., SREERAMA Y.N., RAO D.R. & GOWDA L.R. (1996) Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk Inhibitors. *J.Mol.Evol.* **42**, 560-569.
- PRAKASH B., MURTHY M.R.N., SREERAMA Y.N., RAO D.R. & GOWDA L.R. (1997) Studies on simultaneous inhibition of trypsin and chymotrypsin by horsegram Bowman-Birk inhibitor. *J.Biosci.* **22**, 545-554.
- PRAMANIK B.N., MIRZA U.A., ING Y.H., LIU Y., BARTNER P., WEBER P. & BOSE A.K. (2002) Microwave-enhanced enzyme reaction for protein mapping by mass spectrometry: A new approach to protein digestion in minutes. *Protein Science* **11**, 2676-2687.
- RAGG E.M., GALBUSERA V., SCARAFONI A., NEGRI A., TEDESCHI G., CONSONNI A., SESSA F. & DURANTI M. (2006) Inhibitory properties and solution structure of a potent Bowman-Birk protease inhibitor from lentil (*Lens culinaris*, L) seeds. *The FEBS Journal* **273**, 4024-4039.
- READ M.N.G.R. (1986) Proteinase Inhibitors. *Elsevier Science* 301-335.
- RECHSTEINER M. & HILL C.P. (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *TRENDS in Cell Biology* **15**, 27-33.
- RHO J., QIN, S., WANG.J.Y. & ROEHL M.H.A. (2008) Proteomic expression analysis of surgical human colorectal cancer tissues: up regulation of PSB7, PRDX1, and SRP9 and hypoxic adaptation in cancer. *Journal of proteome research* **7**, 2959-2972.
- RYAN C.A. (1990) Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann Rev Phytopathol.* **28**, 425-449.
- SAITO T., SATO H., VIRGONA N., HAGIWARA H., KASHIWAGI K., SUZUKI K., ASANO R. & YANO T. (2007) Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. *Cancer Letters* **253**, 249-257.
- SANTOS, Alexandre Gonçalves. *Estudos farmacocinéticos de Inibidores Bowman-Birk da semente de Macrotyloma axillare em camundongos Swiss*. Ouro Preto: UFOP, 2006. 85 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências

- Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.
- SCHECHTER I. & BERGER A. (1967) On the size of the active site proteases. I. Papain. *Biochim.Biophys.Res.Commun.* **27**, 157-162.
- SCHELLENBERGER V., BRAUNE K., HOFMANN H.J. & JAKUBKE H.D. (1991) The specificity of chymotrypsin. *Eur.J.Biochem.* **199**, 623-636.
- SCHULTZ J. (1967) Cleavage at aspartic acid. *Methods Enzymol.* **11**, 255-263.
- SMITH P.K., KROHN R.II., HERMANSON G.T., MALIA H.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J. & KLENK D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Bioch.* **150**, 76-85.
- SREERAMA Y.N. & GOWDA L.R. (1997) Antigenic determinants and reactive sites of a trypsin / chymotrypsin double-headed inhibitor from horse gram (*Dolichos biflorus*). *Biochimica et Biophysica Acta* **1343**, 235-242.
- SREERAMA Y.N. & GOWDA L.R. (1998) Bowman-Birk type proteinase inhibitor profiles of horse gram (*Dolichos biflorus*) during germination and seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 2596-2600.
- SUZUKI K., YANO T., SADZUKA Y., SUGIYAMA T., SEKI T. & ASANO R. (2005) Restoration of connexin 43 by Bowman-Birk protease inhibitor in M5076 bearing mice. *Oncol.Rep.* **13**, 1247-1250.
- TANAKA K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc.Jpn.Acad.* **85**, 12-30.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – PLANTS DATABASE – *Macrotyloma axillare*. <http://plants.usda.gov/index.html> . 2003. (Sítio da Internet)
- USTRELL V. HOFFMAN L., PRATT G., RECHSTEINER M. (2002) PA 200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J.* **21**, 3516-3525.
- VOET D., VOET J.G. & PRATT C.W. (2000) Catálise enzimática. In *Fundamentos de Bioquímica*. Primeira edição Ed. Artes Médicas Sul. Porto Alegre: pp. 281-316.
- VOUTSADAKIS I.A. (2008) The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1782**, 800-808.
- WARE J.H., WAN X.S., RUBIN H., SCHECHTER N.M. & KENNEDY A.R. (1997) Soybean Bowman-Birk Protease Inhibitor Is a Highly Effective Inhibitor of Human Mast Cell Chymase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **344**, 133-138.

- WEDER J.K. (1986) Inhibition of human proteinases by grain legumes. *Adv.Exp.Med.Biol.* **199**, 239-279.
- WILKINSON D. (1995) Roles of ubiquitylation in proteolysis and cellular regulations. *Annu.Rev.Nutrition* **15**, 161-169.
- YAVELOW J., COLLINS M., BIRK Y., TROLL W. & KENNEDY A.R. (1985) Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation *in vitro*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **82**, 5395-5399.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)