

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

PLÍNIO CUNHA SATHLER

**Ecotina: análise estrutural de um antitumoral,
sua interação com a haptoglobina e potencial
antibacteriano**

Orientadora: Helena Carla Castro Cardoso de Almeida

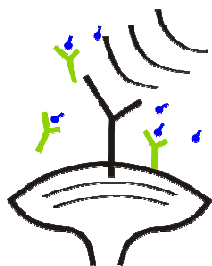


**NITERÓI
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

PLÍNIO CUNHA SATHLER

**Ecotina: análise estrutural de um antitumoral,
sua interação com a haptoglobina e potencial
antibacteriano**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM NEUROIMUNOLOGIA

Orientadora: Helena Carla Castro Cardoso de Almeida



**NITERÓI
2009**

S253 Sathler, Plínio Cunha

Ecotina: análise estrutural de um antitumoral, sua interação com a haptoglobina e potencial antibacteriano./ Plínio Cunha Sathler. Niterói, RJ: [s.n.], 2009.

86f.

**Dissertação-(Mestrado em Neuroimunologia)-
Universidade Federal Fluminense, 2009.**

1. Proteína. 2. Modelagem. 3. Molecular. 4. Inibidor de tripsina. 5. Câncer de próstata. I. Título.

CDD. : 547.75

PLÍNIO CUNHA SATHLER

Ecotina: análise estrutural de um antitumoral, sua interação com a haptoglobina e potencial antibacteriano

Dissertação de mestrado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neuroimunologia.

Banca Examinadora

Dra. Elizabeth Giestal de Araujo - UFF

Dr. Robson de Queiroz Monteiro - UFRJ

Dr. Luiz Roberto Leão Ferreira - UFF

Dr. André Lopes Fuly (revisor e suplente - UFF)

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, o único capaz de criar tudo a partir do nada; de gerar a certeza em meio a dúvida; de produzir força quando a fraqueza nos alcança; de incitar motivação quando o desânimo se aproxima; de dar vida quando a morte é certa, de realizar milagres diante de situações impossíveis.

A Ele toda Glória.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, por me dar forças para lutar.

A minha esposa, pelo amor e cumplicidade

Ao meu pai, pelo encorajamento

A minha mãe, pelas constantes intercessões;

A minha irmã, pelo incentivo;

Aos demais familiares, pela credibilidade;

Aos amigos distantes, pelo apoio;

Aos amigos próximos, pelo amparo em tempos difíceis;

Aos professores, pela dedicação no ensino;

A minha orientadora, pelo grande empenho destinado a minha formação acadêmico-científica;

E por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a produção deste trabalho.

Epígrafe

A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	ix
Classificação dos aminoácidos.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas e Quadros.....	xv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doenças que afetam o sistema nervoso central.....	1
1.1.1. Câncer e tumores cerebrais.....	2
1.1.2. Infecções bacterianas que afetam o sistema nervoso.....	5
1.2. Alvos terapêuticos e inibidores com potencial para o tratamento de doenças que afetam o sistema nervoso central.....	8
1.2.1. Serino-proteases: alvos terapêuticos em potencial.....	8
1.2.2. Ecotina: um inibidor de serino-proteases com potencial terapêutico.....	13
1.2.2.1. Ecotina e processos cancerígenos.....	15
1.2.2.2. Ecotina e infecção bacteriana.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Geral.....	21
2.2. Específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Análise teórica das interações do complexo ecotina-haptoglobina.....	22
3.1.1. Construção do modelo da estrutura monomérica da haptoglobina-1 (HP1) contendo as cadeias leve (α) e pesada (β).....	22
3.1.2. Construção da estrutura dimérica da haptoglobina-1 (HP1).....	23
3.1.3. Construção e caracterização dos mutantes da ecotina.....	23
3.1.4. Análise e validação dos modelos teóricos da HP1 e da ecotina.....	24
3.1.5. Complexos teóricos ternários da ecotina e seus mutantes com a enzima ativadora de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) e a haptoglobina-1 (HP1).....	24
3.2. Análise experimental do perfil antibacteriano da ecotina.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Análise teórica das interações do complexo ecotina-haptoglobina.....	27

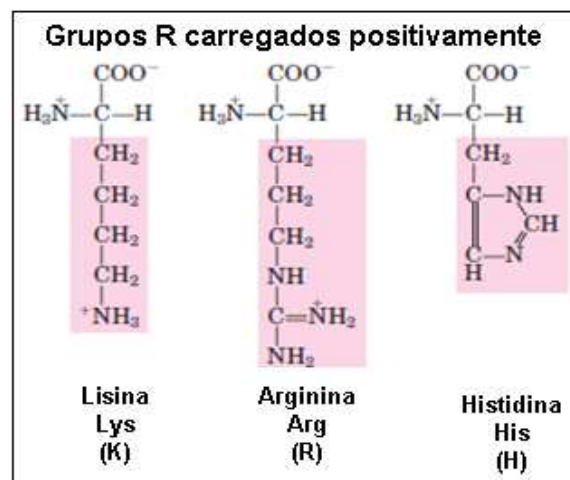
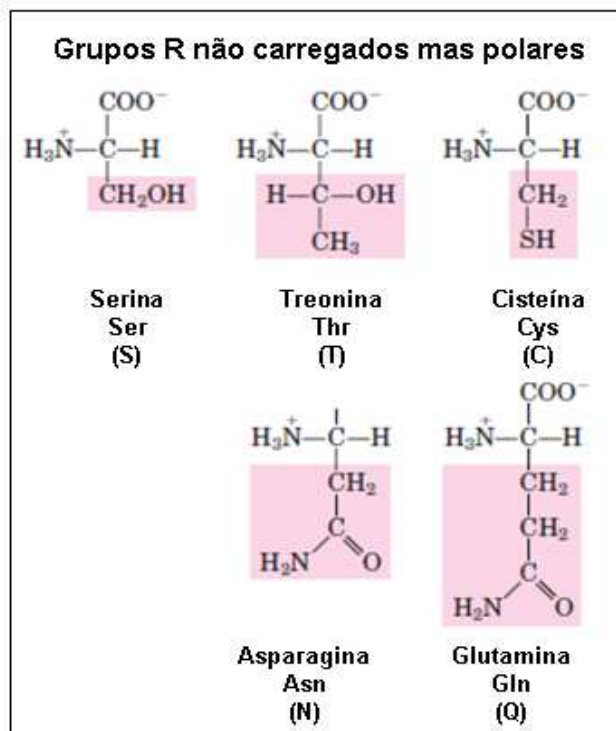
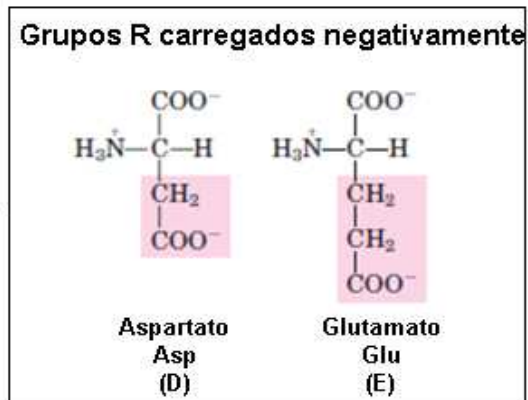
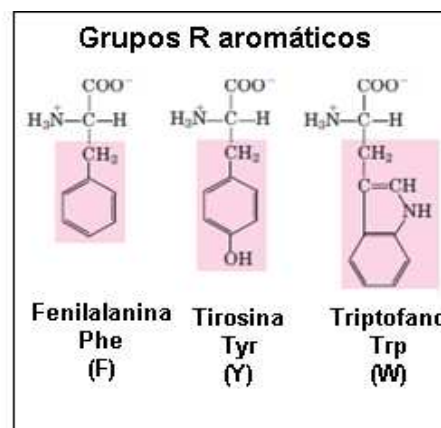
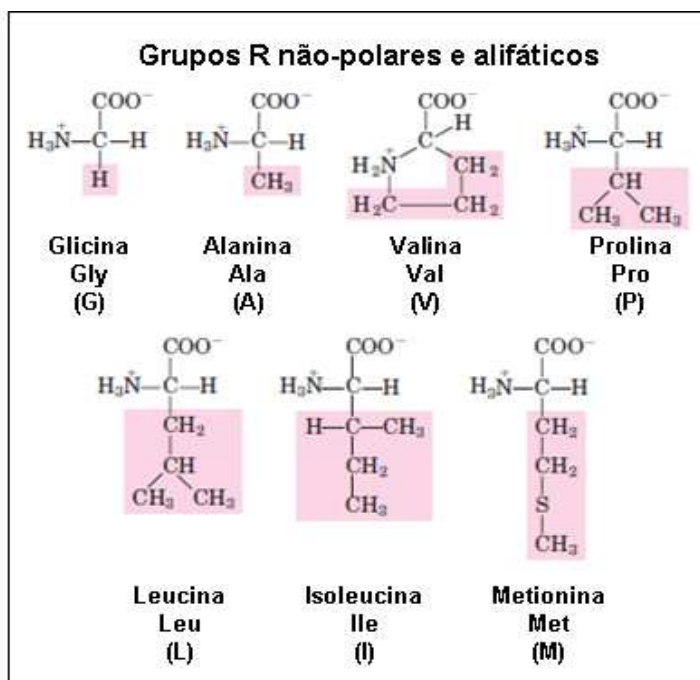
4.1.1. Haptoglobina-1: Construção e avaliação comparativa das cadeias leve (α) e pesada (β).....	27
4.1.2. Haptoglobina-1 monomérica: Construção a partir dos modelos teóricos das cadeias e avaliação comparativa.....	32
4.1.3. Haptoglobina-1 dimerica: Construção e avaliação comparativa.....	35
4.1.4. Ecotina: Construção e caracterização dos mutantes.....	36
4.1.5. Complexos ternários da ecotina e seus mutantes com as proteínas u-PA e haptoglobina.....	37
4.2. Avaliação do potencial antibacteriano da ecotina e seus mutantes sobre cepas multiresistentes.....	39
5. DISCUSSÃO.....	41
5.1. Análise teórica da interação da ecotina e seus mutantes com o dímero da haptoglobina-1 utilizando técnicas de modelagem molecular comparativa.	41
5.1.1. Complexos ternários da ecotina com a haptoglobina e a enzima ativadora de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA).....	45
5.2. Análise potencial antibacteriano da ecotina e seus mutantes contra cepas Gram positivas e Gram negativas multiresistentes.....	48
6. CONCLUSÕES.....	50
6.1. Análise teórica da interação da ecotina e seus mutantes com a haptoglobina-1 utilizando técnicas de modelagem molecular comparativa.....	50
6.2. Análise do potencial antibacteriano da ecotina e seus mutantes contra cepas Gram positivas e Gram negativas multiresistentes.....	51
7. BIBLIOGRAFIA.....	52
8. APÊNDICE	69
8.1. Lista de Artigos Publicados.....	69
8.2. APÊNDICE 1- Sathler <i>et al.</i> , 2009.....	70

Lista de Abreviaturas e Siglas

3D	Tridimensional ou em três dimensões
ATCC	American Type Culture Collection
BPTI	Inibidor da Tripsina Pancreática Bovina
CCP	Proteínas Controladoras do Complemento
CLS	Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial
DEC	<i>E. coli</i> Diarreiogênicas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ecot	Ecotina
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
HbP	Hemoglobina Protease
HP	Haptoglobina
HP1	Haptoglobina-1
HP1a	Cadeia leve da HP1
HP1b	Cadeia pesada da HP1
IC	Inibição do Crescimento
KLK14	Calicreína Tissular Humana 14
LCR	Líquido Céfalo-Raquidiano
LSA	“Loop” do Sítio Ativo
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MMP	Metaloproteases

NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORS	<i>Staphylococcus</i> resistente à oxacilina
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina
ORSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente à oxacilina
P1	Sítio Primário de interação da ecotina
P2	Sítio secundário de interação da ecotina
PDB	Protein Data Bank, Banco de Dados de Proteínas
PMSF	Fluoreto Fenil-Metil-Sulfonil
PRO-MMP	Pro-metaloproteases
RMS	Root mean square, Raiz média quadrática
RR	Ecotina mutante – M84R, M85R
SNC	Sistema Nervoso Central
SPATEs	Serino-Proteases Autotransportadoras de <i>Enterobacteriaceae</i>
TSRR/R	Ecotina mutante – V81T, T83S, M84R, M85R e D70R
u-PA/uPA	Ativador de Plasminogênio do Tipo Uroquinase
uPA-R	Receptor do Ativador de Plasminogênio do Tipo Uroquinase
VO	Via Oral
WT	Wild Type

Classificação dos aminoácidos



*As áreas sombreadas em vermelho são os grupos R

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2002.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Processo de geração de metástase mostrando a invasão do tecido e a entrada da célula neoplásica no sistema circulatório..... **3**
- Figura 2:** Ressonância magnética axial obtida de um paciente com um abscesso bacteriano cerebral superficial (Seta)..... **6**
- Figura 3:** Painel A - Representação da estrutura tridimensional da região da tríade catalítica (His 57, Asp 102, Ser 195) de uma serino-protease clássica (Tripsina) e de seus subsítios S1 (Arg189), S2 (Gly216), S3 (Gly 226) que interagem com inibidores como o inibidor da tripsina pancreática bovina - BPTI (P1 em rosa). Painel B - Esquema da interação dos subsítios (S) presentes na região catalítica das serino-proteases com os resíduos do substrato protéico (P)..... **10**
- Figura 4:** Participação de enzimas proteolíticas como a elastase, o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA), calicreína e metaloproteases (MMP) na ação sobre a matriz-extracelular em um processo de metástase. A seta verde indica a clivagem do plasminogênio em plasmina e a seta vermelha, a ação proteolítica da u-PA neste evento..... **11**
- Figura 5:** Complexo heterotetramérico formado por duas moléculas de tripsina (verde e azul escuro) e duas de ecotina (amarelo e rosa), mostrando os loops envolvidos do inibidor (loops 100 - rosa, 60 e 80 - vermelho, 50 - amarelo, 80 - azul claro e 60 e 100 - verde). Alguns resíduos importantes são mostrados tanto no sítio primário (M84 e R54) quanto no secundário (W67, D70 e R108)..... **14**
- Figura 6:** Representação esquemática das diferentes estruturas protéicas correspondentes aos fenótipos da Haptoglobina..... **17**
- Figura 7:** Atividade enzimática do u-PA sobre substrato cromogênico na presença de ecotina RR (2 nM) e haptoglobina (2 μ M)..... **19**
- Figura 8:** Estrutura primária da HP1 mostrando o peptídeo sinal (em verde) e as cadeias leve (α) (em vermelho) e pesada (β) (em azul)..... **27**
- Figura 9:** Alinhamento multiseqüencial das cadeias leve (A) e pesada (B) da haptoglobina-1 (HP1Fa e HP1Fb) com proteínas similares. Os aminoácidos marcados são os idênticos (*), os conservados (:), e os semiconservados (.). As proteínas comparadas foram as proteases do sistema do complemento C1r (domínio catalítico ativo - 1md8a e zimogênio - 1gpza) e C1s (1elva), a apolipoproteína - H (1c1za), quimotripsina (1ca0), elastase (1brup), quimase (1pjp), tripsina (1sgt), trombina (1a2c), fator X da coagulação (1c5m). As estruturas secundárias, α -hélice e β -pregueada estão em vermelho e verde, respectivamente. O preenchimento dos espaços entre seqüências para adequação do alinhamento é indicado por (-)..... **28**

- Figura 10:** Comparação dos modelos das cadeias leve e pesada da HP1 com proteínas similares, incluindo proteases do sistema do complemento - C1r (domínio catalítico ativo - 1md8a e zimogênio - 1gpza) e C1s (1elva), a apolipoproteína-H (1c1za), quimotripsina (1ca0), elastase (1bru), quimase (1pjp), tripsina (1sgt), trombina (1a2c), fator X da coagulação (1c5m). (A) Representação das estruturas secundárias (α -hélice – vermelho, β -pregueada – verde e alças - azul claro) e (B) Mapa de potencial eletrostático com as regiões neutras em branco, carregadas positivamente em azul, e negativamente em vermelho..... **30**
- Figura 11:** Comparação dos valores da media quadrática (RMS) resultantes do alinhamento estrutural das cadeias leve (A) e pesada (B) da HP1 com as proteínas similares incluindo proteases C1r - domínio catalítico zimogênio (1gpza) e ativo (1md8a) e C1s (1elva), apolipoproteína – H (1c1za), elastase (1brup), quimase (1pjp), tripsina (1sgt), quimotripsina (1ca0), trombina (1a2c) e fator de coagulação X (1c5m).)..... **32**
- Figura 12:** Modelo teórico monomérico final da HP1. (A) Cadeia leve (amarelo escuro) e pesada (lilás) ligadas por ponte dissulfeto (rosa) (B) Representação das estruturas secundárias - α -hélice em vermelho, β -pregueada em verde e alças em azul, (C) Mapa de potencial eletrostático em branco regiões neutras, em azul regiões carregadas positivamente e em vermelho negativamente e (D) Comparação dos valores da raiz da media quadrática (RMS) resultantes do alinhamento estrutural do monômero de HP com proteínas similares incluindo as proteases c1r, domínio catalítico zimogênio (1) e ativo (4) e c1s do sistema complemento (2), apolipoproteína – H (3), elastase (5), quimase (6), tripsina (7), quimotripsina (8), trombina (9) e fator de coagulação X(10)..... **33**
- Figura 13:** Validação do modelo monomérico de HP1 utilizando (A) o gráfico de Ramachandran e comparação da distribuição de aminoácidos nas áreas favorável (vermelho), permitida (amarelo) e proibida (branco) com a proteína molde, a protease C1r (1gpza) (B) A estrutura secundária do modelo mostra a localização dos quatro aminoácidos (vermelho) distribuídos em áreas proibidas de HP1..... **34**
- Figura 14:** Modelo teórico da HP1 dimérica mostrando em (A) A1 - a cadeia leve (amarelo escuro) e pesada (lilás) e pontes dissulfeto intercadeia (rosa); A2 - as estruturas secundárias (α -hélices – vermelho, β -pregueadas – verde e alças - azul); A3 - o mapa de potencial eletrostático (positivo – azul negativo – vermelho); em (B e C) o gráfico de Ramachandran, a comparação da distribuição de aminoácidos nas áreas favorável (vermelho) permitida (amarelo), e proibida (branco) com a proteína molde (1gpza) e localização dos oito aminoácidos (Ala60, His131, Gln152 e Lys 214) dispostos igualmente em números de quatro em cada monômeros distribuídos em áreas proibidas(vermelho).....,..... **35**

Figura 15: Comparação da ecotina selvagem (wt) com os modelos teóricos de seus mutantes (RR e TSRR/R) (A) Estrutura secundária (β -pregueada em verde), mostrando a localização dos aminoácidos substituídos. (B) Mapa de potencial mostrando regiões neutras (branco), carregadas positivamente (azul) e negativamente (vermelho)..... **36**

Figura 16: (A) Modelo esquemático da interação entre o complexo hemoglobina-haptoglobina e o receptor de CD163(Adaptado de MADSEN et al., 2004) e (B) nosso modelo teórico da HP1(lilás) mostrando os resíduos de aminoácidos que são envolvidos nas interações com hemoglobina (amarelo escuro) e receptor CD163 (rosa)..... **45**

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1: Classificação dos tumores de SNC derivados do tecido neuroepitelial.....	4
Tabela 1: Tratamentos utilizados nas infecções do Sistema Nervoso Central.....	7
Tabela 2: Avaliação <i>in vivo</i> do perfil anticancerígeno da ecotina selvagem e o do mutante Met84Arg/ Met85Arg.....	16
Tabela 3: Relação entre dos códigos do PDB e suas respectivas proteínas e complexos.....	25
Tabela 4: Comparação do grau de similaridade entre a seqüência das cadeias leve (α) e pesada (α) da Haptoglobina-1 e de proteínas homólogas.....	29
Tabela 5: Comparação dos modelos ternários formados por u-PA (vermelho), HP1 (azul), Ecotina selvagem (verde) e suas formas mutantes RR (laranja) e TSRR/R (cinza) e das ligações de hidrogênio observadas. O número (2) indica a presença de duas interações.....	38
Tabela 6: Comparação do efeito da ecotina selvagem e seus mutantes (2,5 mg/mL) no crescimento bacteriano utilizando discos de difusão (Halo em mm) ou incubação direta com a cultura líquida (inibição do crescimento = IC em %). Os resultados expressam a média \pm S.D de 3 experimentos individuais.....	40

RESUMO

A ecotina é um inibidor de serino-proteases do tipo competitivo encontrado no periplasma da bactéria *Escherichia coli*. Esta proteína possui 142 resíduos de aminoácidos, e se apresenta em concentrações submicromolares, sob a forma de um homodímero mantido pela interação entre as regiões C-terminal. Este inibidor e seus mutantes têm sido testados quanto a capacidade inibitória sobre diferentes doenças, como o câncer de próstata e tumor cerebral. Um estudo recente do nosso grupo mostrou que ao ser administrada por via intravenosa, a ecotina permanece por mais tempo na circulação sanguínea (14h) quando comparadas com proteínas do mesmo tamanho (30 min). Essa manutenção prolongada da ecotina circulante se deve provavelmente pela ligação com a haptoglobina, uma α_2 -sialoglicoproteína plasmática dimérica. Neste trabalho, temos como objetivo identificar as interações envolvidas neste processo de formação do complexo ecotina-haptoglobina utilizando técnicas de modelagem molecular. Esse estudo incluiu também a avaliação experimental do possível perfil antibacteriano da ecotina e de sua potencialidade como um protótipo para o desenvolvimento de fármacos com propriedades antibióticas.

No estudo de modelagem molecular, os modelos teóricos do monômero, do dímero da haptoglobina, e das ecotinas mutantes construídos nesse trabalho se mostraram estáveis e confiáveis pela análise do gráfico de Ramachandran. A análise comparativa dos modelos utilizando proteínas similares indica uma conservação estrutural significativa das moléculas estudadas, visto os baixos valores de raiz média quadrática (RMS) encontrados. Os complexos ecotina-haptoglobina construídos a partir dos respectivos modelos revelaram a ligação através do sítio secundário da ecotina, com formação de várias interações, com a possibilidade ainda de ligação deste inibidor com a enzima alvo pelo sítio primário. Estes dados confirmam os resultados experimentais descritos na literatura por nosso grupo que apontaram a formação do trímero enzima-ecotina-haptoglobina. Fatores estruturais importantes condicionam a formação do complexo trimérico (haptoglobina-ecotina-u-PA) como a estrutura do inibidor (Monômero ou dímero) e mutações pontuais como M84R/M85R (RR) e D70R, V81T, T83S, M84R e M85R (TSRR/R). A interação da haptoglobina com as ecotinas mutantes (principalmente a TSRR/R) gera um padrão de ligação com o envolvimento de novos resíduos, o que sugere um aumento da energia de interação entre estas moléculas. Esses dados poderiam justificar o tempo de circulação da ecotina no sangue por 14h, o que evitaria sua metabolização precoce. No estudo experimental, a ecotina não apresentou efeito antibacteriano contra cepas Gram-negativas e Gram-positivas multirresistentes oriundas do Hospital Universitário Antônio Pedro, Niterói, Rio de Janeiro. Entretanto, a hipótese de uma possível atividade antimicrobiana não pode ser completamente descartada, tendo em vista que outras bactérias e condições de cultivo ainda podem ser avaliadas.

Palavras chave: Modelagem Molecular Comparativa, Haptoglobina, Ecotina.

ABSTRACT

The ecotin is a competitive serine proteases inhibitor from *Escherichia coli* periplasm. This protein presents 142 amino acids residues, and presents at submicromolar concentration a homodimeric form maintained by the interaction between the C-terminal regions. Recently, this inhibitor and its mutants have their inhibitory capacity tested against different pathologies, such as prostate cancer and brain tumor. A recent study of our group showed that in the intravenous therapy the ecotin is able to bind to haptoglobin, a dimeric plasmatic α 2-sialoglycoprotein, which is probably responsible for the maintenance of this inhibitor in the circulation longer (14h) when compared to proteins with same molecules weight (30min). In this work, our purpose was to use molecular modeling techniques to identify the interactions involved in the formation of haptoglobin-ecotin complex that would explain such differences in circulation pattern. This study also included the experimental evaluation of the feasible ecotin antibacterial profile and its potential as a antibiotic prototype.

In the molecular modeling study the theoretical models of haptoglobin monomeric and dimeric forms and the ecotin mutants were stable and reliable through the Ramachandran analysis. The models comparative analysis using similar proteins pointed to a significant conservation of the tridimensional structure with low values of root mean square (RMS). The ecotin-haptoglobin complex that was constructed using these models revealed the binding through ecotin secondary site with formation of several interactions and the feasibility of the inhibitor binding to a target enzyme (*i.e.* u-PA) through the primary site. These data confirmed the experimental results described in the literature by our group that showed the formation of a trimeric complex enzyme-ecotin-haptoglobin. Important structural factors control the formation of the trimeric complex (haptoglobin-ecotin-u-PA) such as the inhibitor structure (monomer or dimer) and site directed mutation like M84R/M85R (RR) e D70R, V81T, T83S, M84R e M85R (TSRR/R). The interaction of haptoglobin with the ecotin mutants (mainly TSRR/R) generated a binding pattern with participation of new residues, which suggests an increase of the interaction energy among these molecules. These data may justify the circulation time of ecotin on the blood for 14h, which would avoid its early metabolic processing. In addition, ecotin was not capable of inhibiting either Gran-negative and Gran-positive strains of bacteria that were obtained for Hospital Universitário Antônio Pedro, Niterói, Rio de Janeiro. However, the hypothesis of ecotin antimicrobial activity should not be completely discharged as other bacteria strains and growth conditions may be evaluated.

Keywords: Comparative Molecular modeling, Haptoglobin

1- INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS QUE AFETAM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os avanços do conhecimento na área da Neurociência têm modificado progressiva e profundamente o cenário científico nos últimos anos. Esses avanços foram causados, dentre vários motivos, pela possibilidade de uso de técnicas e métodos que envolvem desde a genética molecular até a sofisticação de imagens do cérebro humano *in vivo*. Compreender a dinâmica do cérebro e de suas conexões, tanto em estado de normalidade como em estados patológicos é, de modo geral, o objetivo ainda premente da Neurociência (VOGT, 2002; SANTOS, 2006). Esta área da ciência estuda desde os neurônios e as demais células formadoras do tecido nervoso (ex: células da glia), até o equilíbrio funcional desse tecido, buscando compreender os mecanismos da memória e a origem das emoções, bem como a evolução de lesões cerebrais observadas em diversas doenças (OLIVEIRA, 2006; TONINATO, 2007).

As enfermidades que afetam o sistema nervoso central, seja de forma direta ou indireta, de modo geral geram um grande impacto socioeconômico. As funções neurológicas específicas são muitas vezes localizadas em grupos distintos de neurônios que, se afetados, produzem alterações clínicas que não podem ser corrigidas por outros neurônios. Relativamente incapazes de se regenerar (ex: lesões destrutivas focais causam déficits clínicos permanentes), certos neurônios têm vulnerabilidade seletiva à lesão, dependendo das diferenças de estrutura e função (MITCHELL *et al.*, 2006).

O câncer e as infecções bacterianas estão entre os diversos quadros patológicos diretos ou indiretos, de gravidade eminente, que acometem o sistema nervoso e cujo tratamento ainda é ineficiente considerando-se a urgência da administração do mesmo (TYLER, 2009; FLICKINGER, 2009). Para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficientes contra essas enfermidades, torna-se necessário o entendimento de certos aspectos tanto do sistema nervoso afetado como os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no progresso destas doenças e durante o seu tratamento. A compreensão desses processos pode

melhorar e auxiliar na criação destas novas propostas de tratamento para os pacientes afetados.

1.1.1 Câncer e tumores cerebrais

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo migrar para outras regiões do organismo (metástase) (PASTERNAK, 2002; BROWN e ATTARDI, 2005). Este quadro patológico é observado quando há falhas no controle do ciclo de divisão e diferenciação celular e/ou desequilíbrio nos mecanismos de apoptose, gerando uma desestabilização e indiferenciação celular.

Em geral, a célula cancerosa acumula mutações em diferentes genes ou grupos de genes tendendo a um crescimento agressivo e incontrolável, determinando a formação de neoplasias malignas. Assim, a proliferação descontrolada de uma simples linhagem celular pode gerar a invasão de tecidos vizinhos com disseminação metastática (GOMES, 1997; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1997; URONEWS, 2003; PASTERNAK, 2002; GREENMAN *et al.*, 2007).

Os tumores malignos podem ser caracterizados pela falta de diferenciação celular, rápida taxa de crescimento, significativo caráter invasivo e pela capacidade metastática (MITCHELL *et al.*, 2006). Uma etapa crucial durante a invasão tumoral e metástase é a destruição das barreiras biológicas, como por exemplo, a membrana basal, o que requer ativação de enzimas proteolíticas (**Figura 1**). Vários estudos demonstram que a produção aumentada de metaloproteases (HU *et al.*, 2006), cisteíno-proteases (REINHECKEL *et al.*, 2008) e serino-proteases (FAYARD *et al.*, 2009), dentre outras enzimas, são responsáveis por esse processo de proteólise, contribuindo assim para a invasão do tumor, a metástase e a angiogênese (MCCAWLEY e MATRISIAN, 2000; DUFFY *et al.*, 2008).

Dentre esse grupo de doenças, as neoplasias cerebrais constituem um grupo bastante heterogêneo com relação a epidemiologia, a apresentação clínica, o diagnóstico anátomo-patológico, o tratamento e o prognóstico (BEHIN *et al.*, 2003; VALERA, 2006; GERSTNER *et al.*, 2009). Há quase um século, a classificação histopatológica destas neoplasias tem sido motivo de revisões sistemáticas, sendo que ainda hoje permanece um desafio para neuropatologistas (VALERA, 2006). A

classificação atual, desenvolvida e adaptada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (KLEIHUES *et al.*, 2002), utiliza-se do tipo celular predominante na neoplasia, expandindo também o conceito de graus de malignidade para os demais tumores cerebrais não derivados de astrócitos (CAVENEY *et al.*, 2000; ARAGÃO *et al.*, 2007). De modo simplificado, a classificação revisada da OMS estratifica os tumores cerebrais em grupos derivados do tecido neuroepitelial, dos nervos periféricos, das meninges, linfomas e neoplasias hematopoéticas, tumores de células germinativas, tumores da região selar e tumores metastáticos (STROTHER *et al.*, 2000; BEHIN *et al.*, 2003).

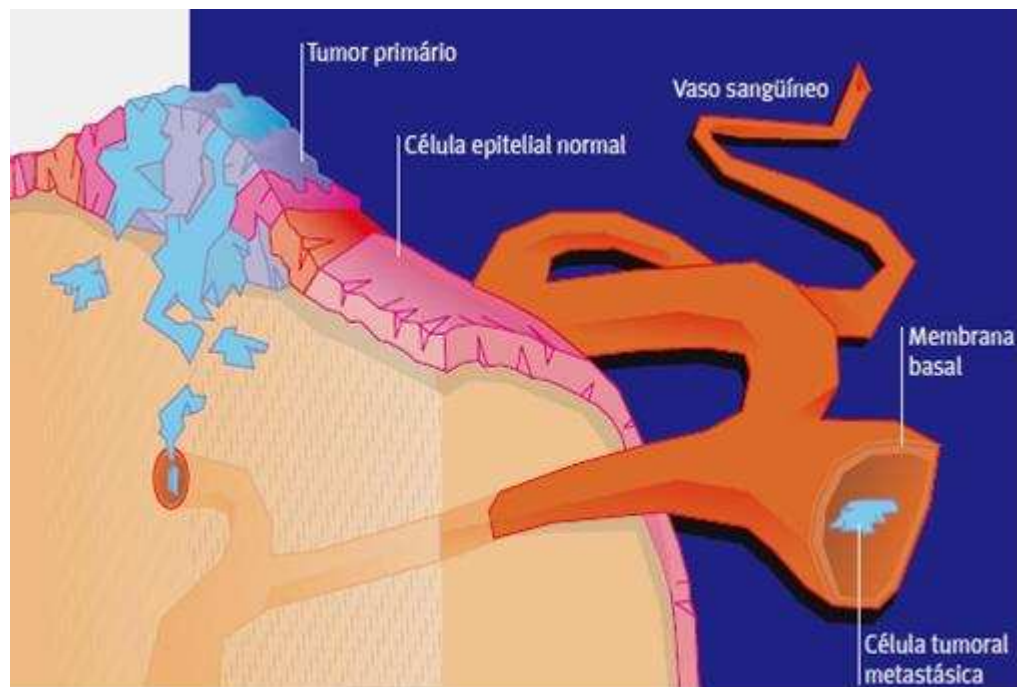


Figura 1: Processo de geração de metástase mostrando a invasão do tecido e a entrada da célula neoplásica no sistema circulatório. (Adaptado de BELIZÁRIO, 2002)

Dos tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), aqueles originados do tecido neuroepitelial, em especial o grupo de gliomas, são os mais comumente observados, tanto em adultos quanto em crianças (**Quadro 1**). No sistema nervoso, os tumores têm várias características importantes que incluem os padrões de:

- **Localização:** A habilidade para ressecção das neoplasias pode ser restringida por características anatômicas funcionais, nas quais mesmo tumores benignos podem apresentar consequências letais, devido à sua localização.

- **Crescimento:** Alguns tumores gliais, incluindo os com características histológicas benignas, infiltram-se em grandes regiões do cérebro, levando a um comportamento clinicamente maligno.
- **Disseminação:** Alguns tipos de tumores disseminam-se pelo SNC; mas até o mais maligno dos gliomas (glioblastoma) raramente metastiza para fora do SNC (MITCHELL *et al.*, 2006).

Quadro 1: Classificação dos tumores de Sistema Nervoso Central derivados do tecido neuroepitelial

TUMORES DE ORIGEM NEUROEPITELIAL
TUMORES GLIAIS
Tumores astrocíticos (astrocitomas pilocítico, fibrilar)
Astrocitoma anaplásico
Tumores oligodendrogliais
Oligodendroglioma
Oligodendroglioma anaplásico
Tumores ependimários
Ependimoma
Ependimoma anaplásico
Ependimoma mixopapilar
Tumores do plexo coróide
Papiloma do plexo coróide
Adenoma de plexo coróide
Carcinoma do plexo coróide
Gliomas mistos e de origem incerta
Oligoastrocitomas, ependimoastrocitomas, oligoastroependimomas
Glioblastoma multiforme
TUMORES MISTOS DE ORIGEM GLIAL E NEURONAL
Ganglioglioma (anaplásico)
Xantoastrocitoma pleomórfico
Tumores de células gigantes sub-ependimários
TUMORES NEURONAIS
Gangliocitoma
Neurocitoma
TUMORES EMBRIONÁRIOS
PNET de fossa posterior (meduloblastoma)
PNET demais localizações com diferenciação
Astrocítica, ependimal, neuronal ou misto
Meduloptelioma
Tumor teratóide-rabdóide

Fonte: Adaptado de VALERA, 2006

Embora a incidência dos tumores cerebrais seja relativamente baixa (cerca de 2% de todas as neoplasias do ser humano), seu grau de mortalidade e morbidade é

extremamente alto. Para os astrocitomas anaplásicos, que se constituem gliomas malignos, esta incidência é cerca de 28,2% com sobrevida de 5 anos (BATCHELOR, 2005). Um dos tratamentos mais comuns para esses quadros patológicos tem sido o uso da dexametasona de forma contínua (4mg VO 6/6h) após uma dose de ataque (8-12mg), visto que o corticóide tem um importante efeito redutor do edema peritumoral.

Com intuito de promover a retirada da massa tumoral ou parte dela, procedimentos de ressecção cirúrgica têm sido preconizados juntamente com a radioterapia e quimioterapia na tentativa de reduzir o tumor, permitindo assim, a cura cirúrgica em alguns casos, como no meduloblastoma (DEANGELIS, 2005; CAIRNCROSS *et al.*, 2006). Apesar destas possibilidades de tratamento, tanto a radioterapia como a quimioterapia apresentam graves efeitos colaterais (mielodepressão, alopecia e alterações gastrointestinais) pela baixa especificidade (SANTOS e CRUZ, 2001). Isso orienta para busca de novas opções de tratamento através do entendimento destas doenças com a identificação de novos alvos terapêuticos e opções de moléculas com potencial farmacológico.

1.1.2 Infecções bacterianas que afetam o sistema nervoso

Meningites bacterianas e outras infecções do SNC ainda persistem como importantes causas de morbidade e mortalidade por mais de meio século, mesmo após a introdução de antibióticos no uso clínico (QUAGLIARELLO e SCHELD, 1992).

Na era pré-antibioticoterapia, a taxa de mortalidade devido às meningites bacterianas era de aproximadamente 100%, caindo para até 10% após a introdução da penicilina (NAU *et al.*, 1998). Contudo, ao longo das últimas três décadas, mesmo com o advento de novos antibióticos, a taxa de mortalidade subiu para 25% em episódios de meningite bacteriana em adultos (DURAND *et al.*, 1993; VAN DE BEEK *et al.*, 2006). As principais causas descritas para essa alta taxa de mortalidade são o desenvolvimento crescente de infecções do SNC causadas por cepas bacterianas resistentes a antibióticos atualmente utilizados (ex: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) e o aumento do número de infecções nosocomiais do SNC, frequentemente causadas por *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase-negativos e bacilos gram-negativos (NAU *et al.*, 1998; MARKANTONIS *et al.*, 2009).

De maneira geral, a meningite é a infecção que atinge as meninges cerebrais, sem afetar o parênquima cerebral. Os principais sintomas de meningite bacteriana, podendo variar com a idade, consistem em febre, cefaléia, fotofobia, vômitos, nível alterado de consciência, convulsões, rash purpúrico e petéquias. Rigidez de nuca pode estar presente em crianças com mais de 2 anos de idade e alterações de consciência e convulsões prolongadas geralmente comprometem a proteção das vias aéreas (BRANCO *et al.*, 2007).

Outras infecções bacterianas que atacam o sistema nervoso e de grande relevância são as infecções supurativas focais agudas, responsáveis pela formação de abscessos cerebrais (**Figura 2**). Se o espaço subdural se tornar infectado, uma tromboflebite pode se desenvolver nas veias que cruzam este espaço, resultando em oclusão venosa e infarto cerebral. As condições predisponentes para o desenvolvimento destas infecções incluem endocardite bacteriana aguda, cardiopatia congênita e infecção pulmonar crônica, sendo os estreptococos e estafilococos, os principais microorganismos causadores envolvidos. (MITCHELL *et al.*, 2006).

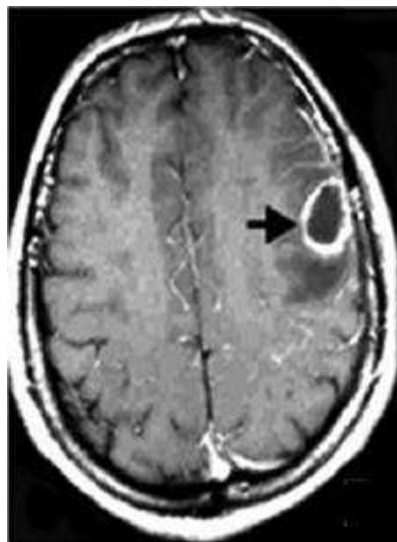


Figura 2: Ressonância magnética axial obtida de um paciente com um abscesso bacteriano cerebral superficial (Seta).
(Adaptado de HAKAN, 2008)

As infecções no SNC provocam uma resposta inflamatória no hospedeiro, mediada por citocinas, eicosanóides (metabólitos do ácido araquidônico) e radicais livres (óxido nítrico). Sabe-se que os mecanismos imunológicos clássicos do hospedeiro são deficientes no SNC, onde anticorpos e complementos estão

ausentes e a atividade fagocitária de macrófagos é ineficiente, permitindo a rápida multiplicação bacteriana neste sítio (SÁ e LIN, 2002). Assim, o tratamento bem sucedido das infecções do sistema nervoso depende de um diagnóstico rápido baseado em uma anamnese adequada e exames laboratoriais (**Tabela 1**) (ANJOS *et al.*, 2004).

Tabela 1: Tratamentos utilizados nas infecções do Sistema Nervoso Central.

Pacientes (Situação)	Etiologia	Antibióticos e dose diária
Neonatos	Estreptococos (grupo B), <i>Escherichia coli</i> e outros Gram negativos entéricos, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Cefotaxima 100-200 mg/kg + Ampicilina * 200 mg/kg
1-2 meses	Bactérias que acometem recém-nascidos e lactentes maiores	Cefotaxima 150 mg/kg + Ampicilina * 250 mg/kg
3 meses - 5 anos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> *, <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Cefotaxima 200 mg/kg ou Ceftriaxona 100 mg/kg + Ampicilina * 200-300 mg/kg
Adultos (<50 anos)	<i>S. pneumoniae</i> *, <i>N. meningitidis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Cefotaxima 6-12 g ou Ceftriaxona 4-2 † g + Ampicilina * 15 g
Adultos (>50 anos)	<i>S. pneumoniae</i> *, <i>L. monocytogenes</i> , bacilos Gram negativos	Cefotaxima 6-12 g ou Ceftriaxona 4-2 † g + Ampicilina * 15 g
Trauma craniano fechado	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>	Cefotaxima 6-12 g ou Ceftriaxona 4-2 † g + Rifampicina 0,6-0,9 g
Infecções com <i>shunts</i> líquóricos	Estafilococos coagulase-negativos, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , bacilos Gram negativos	Vancomicina 2 g + Ceftazidima 6 g
Infecções após neurocirurgia	<i>S. aureus</i> , bacilos Gram negativos, inclusive <i>P. aeruginosa</i>	Vancomicina 2 g + Ceftazidima 6 g
Imunodeprimidos	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> * e outros Gram negativos, inclusive <i>P. aeruginosa</i>	Ampicilina 15 g + Ceftazidima 6 g
Abscesso cerebral e empiema subdural	Estreptococos aeróbios e anaeróbios, <i>S. aureus</i> , <i>Bacteroides</i> spp., bacilos Gram negativos	Cefotaxima 6-12 g + Metronidazol 1,5 g
Abscesso epidural adquirido na comunidade	<i>S. aureus</i> , bacilos Gram negativos, estreptococos, <i>S. aureus</i>	Cefotaxima 6-12 g + Flucloxacilina 8-12 g
Abscesso epidural pós-manipulação cirúrgica	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Vancomicina 2g + Ceftazidima 6 g

Fonte: Adaptado de SÁ E LIN, 2002

Muitas infecções neurológicas não são acompanhadas de sinais sistêmicos ou de evidências laboratoriais detectadas fora do sistema nervoso. Assim, para se obter rapidamente o tratamento apropriado, são usadas diversas informações para

estreitaram o foco do diagnóstico (PRUITT, 1998). Estudos farmacológicos, tanto em animais quanto em seres humanos, têm contribuído para a definição de novas drogas para o tratamento das infecções do SNC. Esses estudos têm ampliado também o conhecimento sobre o funcionamento dessas moléculas, levando a progressos significativos no tratamento clínico de meningites e outras infecções bacterianas (**Tabela 1**) (BÖTTCHER, 2009).

No tratamento das infecções do SNC é importante considerar: a penetração das drogas no líquido céfalo-raquidiano (LCR) e no tecido encefálico, sua distribuição heterogênea nos diferentes compartimentos do SNC, inclusive dentro do próprio espaço liquórico, além da concentração inibitória mínima (MIC) específica dos antibióticos para cada agente etiológico. Assim, para o tratamento dessas infecções com maior eficiência, os conhecimentos dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da terapia antibacteriana no sistema nervoso central também devem ser considerados (SÁ e LIN, 2002).

A resistência bacteriana aos antibióticos é outro problema que surge de forma expressiva nos dias atuais e cuja solução envolve o surgimento e/ou descoberta de novas moléculas capazes de afetar estas cepas multiresistentes (POURNARAS *et al.*, 2009). Entretanto, a busca por novas moléculas sejam de origem sintética ou de origem natural está longe de atender a demanda atual e futura. Desta forma, a investigação por novas moléculas ativas e novos alvos terapêuticos para o tratamento de infecções bacterianas, assim como para os quadros cancerígenos, ainda é uma questão importante para as áreas de pesquisa e médica (BYRD e DAVIS, 2007).

1.2 ALVOS TERAPÊUTICOS E INIBIDORES COM POTENCIAL PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS QUE AFETAM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

1.2.1 Serino-proteases: alvos terapêuticos em potencial

As serino-proteases são hidrolases que utilizam o grupo hidroxila do resíduo de serina na posição 195 para clivar ligações amídicas em proteínas e peptídeos (SERGEI *et al.*, 2005). Apesar do sítio ativo das serino-proteases ser bastante conservado no que se refere à tríade catalítica (His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵), diferenças de

especificidade pelo substrato são nitidamente observadas dentro dessa família (ISHIDA, 2006) (**Figura 3**). Essas diferenças se devem a existência de subsítios específicos no próprio sítio catalítico (S) ou próximo a este, que viabilizam a interação da enzima com resíduos específicos do substrato (P) (**Figura 3**).

O acesso do substrato a região catalítica da enzima e a complementariedade estrutural dessas moléculas são pré-requisitos que determinam o processo de proteólise e a eficiência da interação enzima-substrato, relacionando-se diretamente com a especificidade enzimática. Análises cristalográficas de vários membros da família das serino-proteases revelaram a estrutura do sítio ativo dessas enzimas bem como, a importância dos subsítios mais conservados em regiões próximas ao sítio (S1 - Asp¹⁸⁹, S2 - Gly²¹⁶, S3 - Pro²²⁵, S4 - Gly²²⁶) para o mecanismo de catálise (**Figura 3**) (PERONA *et al.*, 1995, PERONA e CRAIK, 1997, VITORINO-CARDOSO *et al.*, 2006). Assim, a natureza dos resíduos de aminoácidos que compõem estes subsítios (S1, S2... Sn, e S1', S2'... Sn') que interagem com os resíduos complementares do substrato (P1, P2... Pn e P1', P2'... Pn') orientam a especificidade das diversas subfamílias de serino-proteases, restringindo o número de substratos possíveis no meio biológico. A denominação dos subsítios S1-Sn seguem a seqüência em direção a região N-terminal do substrato a partir do grupo carbonila, referente a ligação peptídica a ser clivada, enquanto que S1'-Sn' estão posicionados na direção da porção C-terminal (**Figura 3**) (HUDIG e POWERS, 1993; LIU *et al.*, 2006).

Como citado anteriormente nesta dissertação, câncer e metástase são processos patológicos que envolvem a expressão de diversas enzimas incluindo as serino-proteases (GOEL e CHAUHAN, 1997; AGUIRRE GHISO *et al.*, 1999; AFFARA *et al.*, 2009). A invasão de um tecido normal pelas células cancerígenas é viabilizada pela secreção de várias destas enzimas e pela sua ação sobre a membrana basal e a matriz extracelular. Diversas serino-proteases como o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) (FABBRI *et al.*, 2009), a elastase neutrofílica (SATO *et al.*, 2006) e a calicreína (PAMPALAKIS E SOTIROPOULOU, 2007) têm sido descritas por estarem envolvidas diretamente na invasão de tecidos pelas células tumorais e no processo de metástase (**Figura 4**) (RABBANI, 1998; MCCAWLEY e MATRISIAN, 2000).

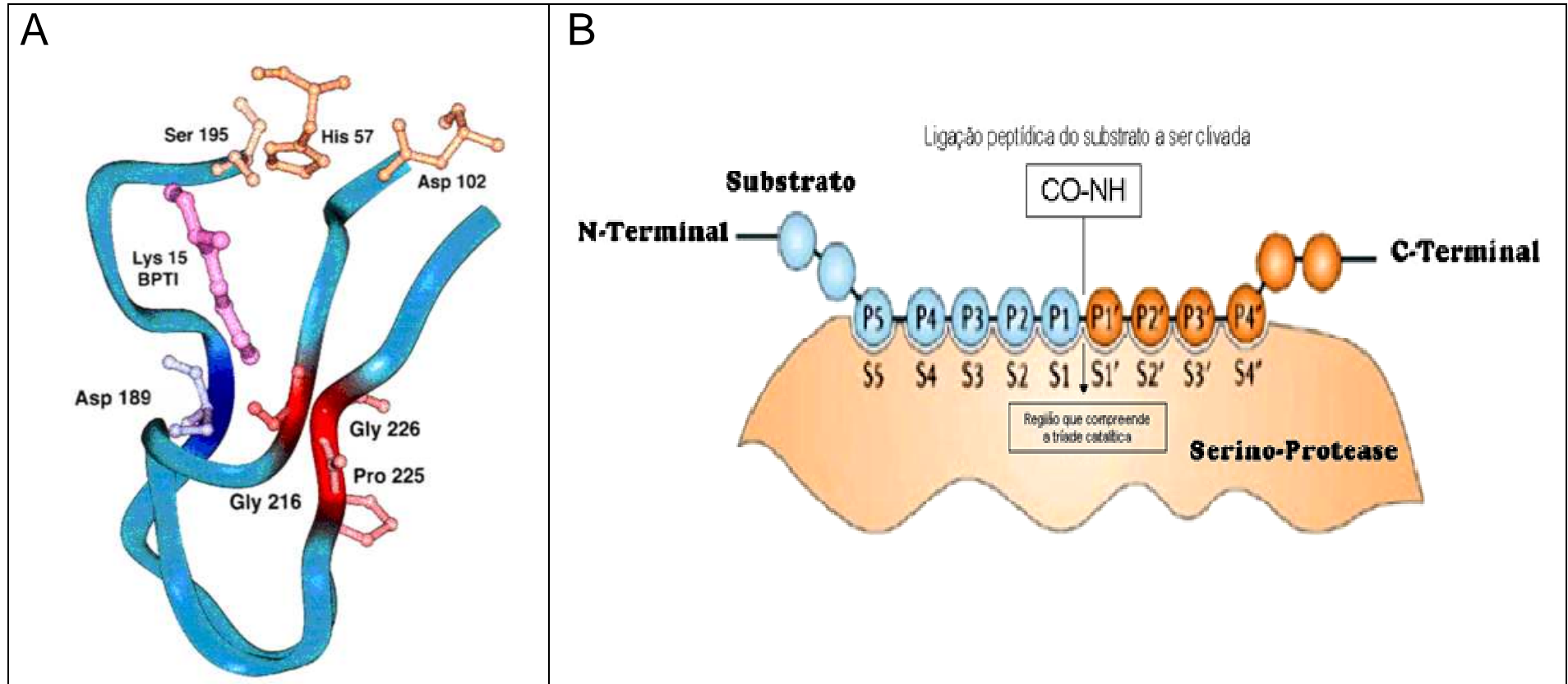


Figura 3: Painei A - Representação da estrutura tridimensional da região da tríade catalítica (His 57, Asp 102, Ser 195) de uma serino-protease clássica (Tripsina) e de seus subsítios S1 (Arg189), S2 (Gly216), S3 (Gly 226) que interagem com inibidores como o inibidor da tripsina pancreática bovina - BPTI (P1 em rosa). Painei B - Esquema da interação dos subsítios (S) presentes na região catalítica das serino-proteases com os resíduos do substrato protéico (P). (Adaptado de PERONA e CRAIK, 1997 e TURK, 2006).

A metástase é um evento complexo onde se observa a elevação dos níveis de u-PA tanto na área da metástase como no plasma (KIRCHEIMER *et al.*,1985; LAUFS *et al.*, 2006). A investigação do envolvimento do u-PA no processo de ativação proteolítica em cascata de proteases intermediárias demonstram que seu mecanismo de ação está diretamente relacionado a ativação do plasminogênio gerando plasmina, sendo esta última responsável pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular (**Figura 4**) (ANDREASEN *et al.*,1997).

Enzimas como a caliceína tissular humana 14 (KLK14), que é uma serino-protease extracelular recém descoberta, participam ativamente deste processo metastático (**Figura 4**) (BORGONHO *et al.*, 2007). Dados clínicos indicam que a expressão desta proteína está ligada ao desenvolvimento de várias doenças, principalmente o câncer e nas várias fases da progressão do tumor, incluindo crescimento, invasão e angiogênese (BORGONHO *et al.*, 2007).

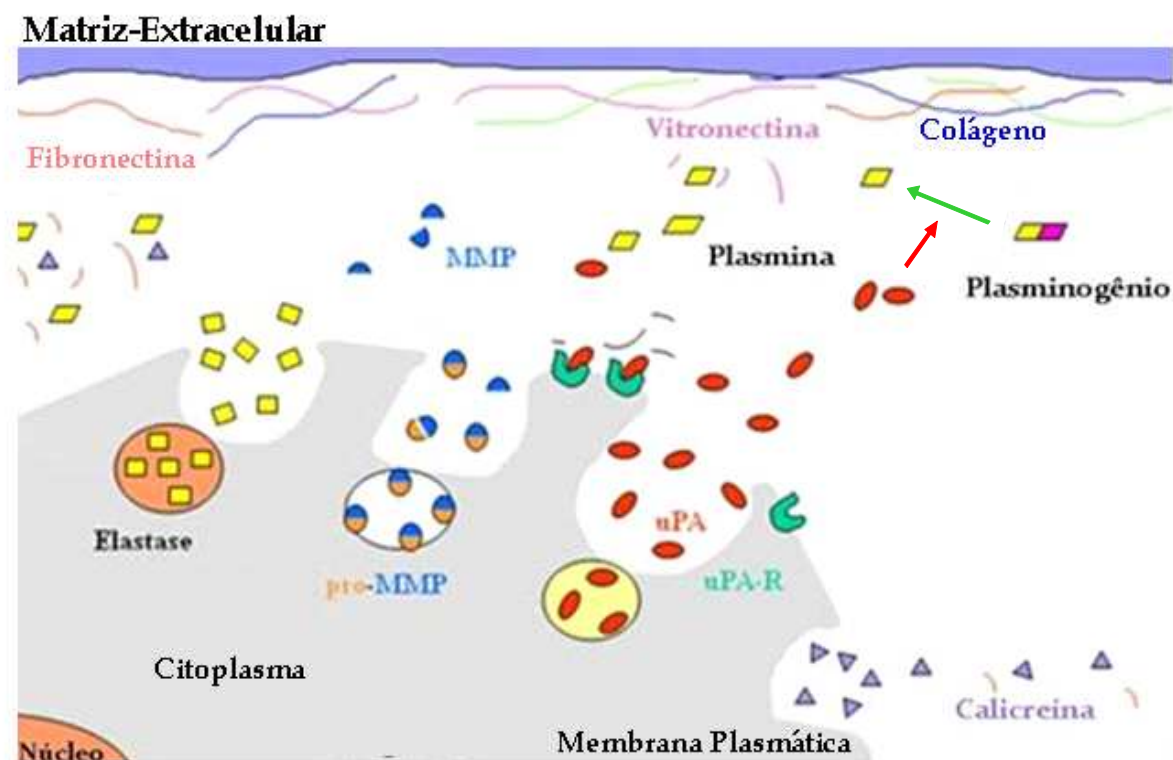


Figura 4: Participação de enzimas proteolíticas como a elastase, o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA), caliceína e metaloproteases (MMP) na ação sobre a matriz-extracelular em um processo de metástase. A seta verde indica a clivagem do plasminogênio em plasmina e a seta vermelha, a ação proteolítica da u-PA neste evento. (Adaptado de MEDDISCOVERY, 2009).

A matriptase é outra serino-protease do tipo tripsina II transmembrana expressa por células de origem epitelial e super-expressa em uma variedade de cânceres de ocorrência em humanos, na qual aparentemente não apenas facilita o processo de invasão celular, mas também ativa vias oncogênicas (UHLAND, 2006).

De forma análoga, nos processos de infecção bacteriana também se observa a participação de serino-proteases produzidas pelos microorganismos patogênicos que poderiam ser alvos terapêuticos em potencial. As serino-proteases autotransportadoras de *enterobacteriaceae* (SPATEs) compreendem um amplo grupo de serino-proteases do tipo tripsina que são secretadas por bactérias enteropatogênicas como *Shigella spp*, *E. coli* uropatogênicas, e todas as *Escherichia. coli* diarreiogênicas (DEC) (YEN *et al.*, 2008). Estas toxinas são secretadas através da membrana para o meio externo por vias autotransportadoras, sendo somente possível devido à presença de um domínio translocador na região C-terminal da estrutura β -barril das proteases em questão. Na região N-terminal das SPATEs verifica-se uma α -hélice bastante conservada que se encontra presente em quase todas as proteínas autotransportadoras (HENDERSON *et al.*, 2004).

A família das SPATEs está organizada filogeneticamente em duas classes: a) classe I, que inclui SPATEs citotóxicas para as células epiteliais como a Pet, que é produzida pela *E. coli* enteroagregativa (EAEC), a EspP de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), EspC de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), SigA de *Shigella flexneri*, e a Sat produzida por *E. coli* uropatogênica, e b) classe II, que agrega SPATEs com as mais diversas características fenotípicas e conhecidas por clivar a mucina, uma glicoproteína complexa presente nos mucos, no líquido sinovial, em certos quistos e, normalmente, na urina. Várias cepas de *E. coli* enteroagregativas e *Shigella* expressam a Pic, uma mucinase codificada no cromossomo 22. A Pic auxilia na colonização intestinal via um mecanismo ainda desconhecido. Juntamente com a Pic pertencem a classe II a SepA da *Shigella flexneri* e Tsh produzida pela *E. coli* presente em aves (BOISEN *et al.*, 2009).

A aquisição de ferro é essencial para a sobrevivência e patogenicidade bacteriana em algumas bactérias. Este processo tem conseqüentemente o envolvimento de uma variedade de sistemas de captação que extraem o ferro e o Heme de proteínas hospedeiras, como a hemoglobina. A hemoglobina protease (HbP) é uma SPATE que foi descoberta como um fator envolvido na simbiose e

patogenicidade da *E. coli* e *Bacteróides fragilis*, as quais causam abscessos intra-abdominais. Liberada pela *E. coli*, esta serino-protease autotransportadora degrada a hemoglobina e distribui o grupo heme para ambas as espécies bacterianas. A HbP é altamente expressa por *E. coli* durante peritonites e tem um papel no sinergismo bacteriano com *B. fragilis*, sendo considerada um alvo no tratamento de peritonites (OTTO *et al.*, 2005).

Algumas cepas de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), responsáveis pelo quadro de diarreia infantil, secretam uma serino-proteases autotransportadora conhecida como EspC. O papel patogênico da EspC na infecção por EPEC é ainda desconhecido. Recentes estudos mostram que a EspC interage com a hemoglobina e a degrada, sugerindo que a proteólise da hemoglobina pela EspC contribui para a utilização do grupo heme e do ferro da hemoglobina para o crescimento bacteriano (DRAGO-SERRANO *et al.*, 2006).

Considerando-se a participação significativa de serino-proteases em processos patológicos que afetam o SNC como o câncer e metástase e as infecções bacterianas, a descoberta de inibidores eficientes e seletivos para estes alvos terapêuticos pode auxiliar no desenvolvimento de moléculas mais eficientes e com menores efeitos colaterais para o tratamento de pacientes acometidos por essas enfermidades.

1.2.2 Ecotina: um inibidor de serino-proteases com potencial terapêutico

A ecotina é um inibidor competitivo de serino proteases, encontrado no periplasma da *E. coli* capaz de inibir a tripsina, quimotripsina e elastase, além de outras serino-proteases com estrutura tridimensional do tipo tripsina (CHUNG *et al.*, 1983; CASTRO *et al.*, 2006; MCCRUDDEN *et al.*, 2009). Este inibidor (142 resíduos de aminoácidos) tem uma metionina na posição P1 (posição 84) e pode ser encontrado sob forma monomérica ou dimérica, de acordo com sua concentração em solução (nM e μ M, respectivamente) (MCGRATH *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 2006). O dímero da ecotina é mantido pela interação entre as regiões C-terminais dos monômeros e sua ligação à enzima-alvo ocorre através de um mecanismo diferente dos inibidores descritos até então (**Figura 5**) (PAL *et al.*, 1996; SHIN *et al.*, 1996). As estruturas cristalográficas de alta resolução da ecotina complexada com a colagenase ou com a tripsina mostram que o dímero de ecotina

é capaz de se ligar a duas moléculas de enzima pelos lados opostos (**Figura 5**) (PERONA e CRAIK, 1997; GILLMOR *et al.*, 2000).

O complexo heterotetramérico formado pelo dímero de ecotina e as duas moléculas de tripsina possui diversas características, que o difere de outros complexos envolvendo serino-proteases e inibidores já conhecidos (MÉTHOT *et al.*, 2007; ZHOU e CARRELL, 2008). De forma interessante, cada tripsina faz contato direto com dois sítios distintos de cada monômero de ecotina, sendo que do ponto de vista do mecanismo de ação, a inibição pela ecotina apresenta novas características, além das já descritas no mecanismo do tipo substrato. Neste caso, a primeira região de interação entre essas moléculas chamada de sítio primário de ligação envolve o “loop do sítio ativo” (LSA) da ecotina, a alça 80 (resíduos 80-88), e o sítio ativo da tripsina. O segundo sítio de interação, conhecido como sítio de ligação secundário, inclui duas alças da ecotina, as alças 60 (resíduos 66-70) e 100 (resíduos 108-113), e a região C-terminal da protease, incluindo a α -hélice e a alça 90 da tripsina (MCGRATH *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 1998).

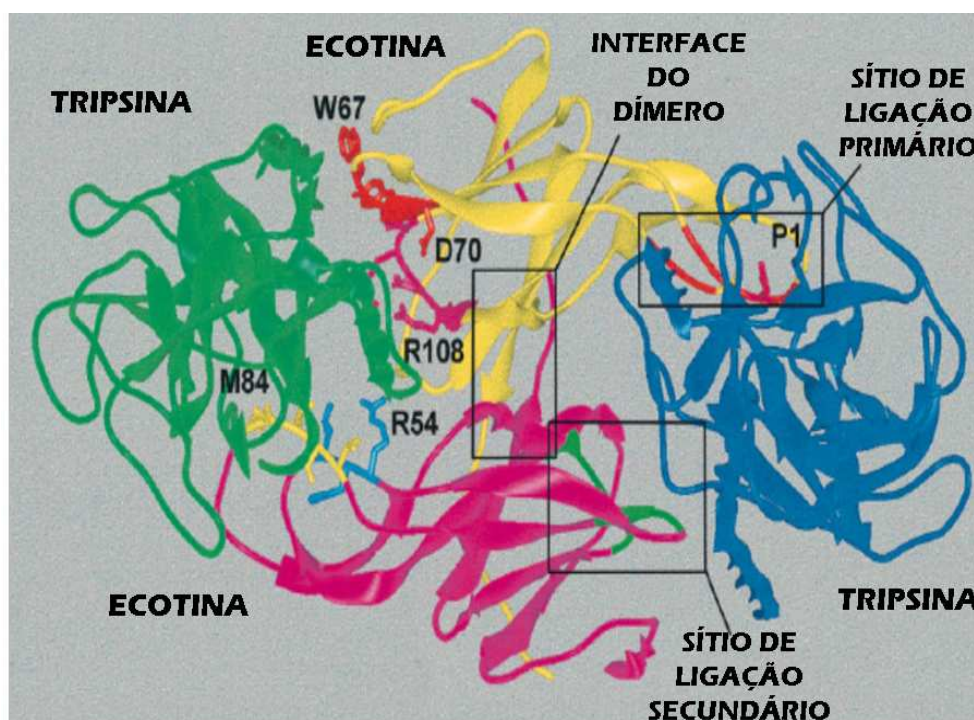


Figura 5: Complexo heterotetramérico formado por duas moléculas de tripsina (verde e azul escuro) e duas de ecotina (amarelo e rosa), mostrando os loops envolvidos do inibidor (loops 100 - rosa, 60 e 80 - vermelho, 50 - amarelo, 80 - azul claro e 60 e 100 - verde). Resíduos importantes são mostrados no sítio primário (M84 e R54) e no secundário (W67, D70 e R108). (Adaptado de YANG *et al.*, 1998).

O sítio P1 (Met⁸⁴) da ecotina parece definir a afinidade desta molécula, mas, diferente do que ocorre na maioria dos inibidores naturais das serino-proteases, não interfere em sua especificidade (LASKOWISKY e KATO, 1980). A α 1-antitripsina, um inibidor natural, que também apresenta uma metionina na posição P1, perde toda sua atividade inibitória frente a elastase, quando tem essa posição mutada por uma arginina (COURTNEY *et al.*, 1985). O mesmo não se observa com a ecotina que, ao sofrer uma mutação na posição P1 (Met84Arg), diminui sua afinidade pela elastase sem perder sua capacidade inibitória, quando utilizada em concentrações maiores. Nesta situação, a ecotina tem sua afinidade orientada para o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) (SEONG *et al.*, 1994).

Os resultados de diversos estudos com o sítio primário da ecotina descritos na literatura até hoje inferem a importância de outros aminoácidos além da metionina 84 (P1) na determinação da especificidade inibitória da ecotina (PAL *et al.*, 1994; SEONG *et al.*, 1994; SEYMOUR *et al.*, 1994). A substituição no sítio secundário por múltiplas alaninas mostrou o envolvimento e a importância dessa região na interação da ecotina com a protease alvo, visto que diminui drasticamente sua atividade inibitória frente a algumas enzimas como o u-PA (YANG e CRAIK, 1998; MCCRUDDEN *et al.*, 2009). Essas avaliações têm direcionado os estudos para a construção de mutantes mais eficientes frente a essas serino-proteases, demonstrando não só a importância do sítio secundário como também a variação no reconhecimento e afinidade da ecotina e seus mutantes pela região C-terminal de diferentes enzimas (YANG *et al.*, 1998).

1.2.2.1. Ecotina e processos cancerígenos

Modelos experimentais de cultura de células cancerígenas da próstata ventral de roedores tem demonstrado o potencial da ecotina como agente antitumoral pela observação da diminuição do crescimento e diferenciação destas células pela incubação com essa molécula (WANG *et al.*, 1995; TAKEUCHI *et al.*, 1999). Dados de ensaios de ELISA e Northern blotting utilizando células epiteliais humanas de câncer de próstata (PC-3) inferem que o mecanismo de inibição da ecotina no processo de metástase está relacionado diretamente a sua ação inibitória sobre serino-proteases que são secretadas por estas células, incluindo o u-PA (YOSHIDA *et al.*, 1994; TAKEUCHI *et al.*, 1999).

Estudos *in vivo* recentes demonstram que o mutante RR ecotina (Met84Arg e Met85Arg) é capaz de inibir a metástase de células tumorais no cérebro, fêmur e pulmão (TAKEUCHI, comunicação pessoal, 2009). Nestes estudos, verificou-se uma diminuição no tamanho dos tumores primários, bem como a redução do número de animais com metástase, quando tratados com ecotina e seus mutantes em relação ao controle (**Tabela 2**). O tratamento com a ecotina selvagem parece agir de maneira mais eficiente na redução do tamanho do tumor, enquanto o tratamento com o mutante Met84Arg/Met85Arg (RR) parece reduzir mais efetivamente a metástase do tumor nos tecidos avaliados (**Tabela 2**) (TAKEUCHI, comunicação pessoal, 2009).

Tabela 2: Avaliação *in vivo* do perfil anticancerígeno da ecotina selvagem e o do mutante Met84Arg/ Met85Arg.

Tratamento	Tamanho do Tumor Primário (mm ²)	Número de animais com metástase		
		Cérebro	Fêmur	Pulmão
Ecotina R84/R85	71	0/5	0/5	0/5
Ecotina (Selvagem)	40	1/6	0/6	1/6
Tampão	170	1/5	1/5	1/5

Fonte: TAKEUCHI, comunicação pessoal, 2009

O estudo da caracterização das serino-proteases envolvidas no processo de inibição tumoral e/ou metastático pela ecotina pode levar a um maior conhecimento sobre o estabelecimento destas doenças, bem como auxiliar no desenho de novas drogas para o combate ao processo de invasão e metástase.

A fim de identificar possíveis serino-proteases envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos, estudos realizados pelo nosso laboratório, em conjunto com o Dr. Charles Craik da Universidade da Califórnia em São Francisco, utilizando uma coluna de afinidade ligada aos mutantes de ecotina (Met84Arg e Met85Arg) e (Val81Thr, Thr83Ser, Met84Arg, Met85Arg e Asp70Arg), mostrou que a ecotina é capaz de se ligar a haptoglobina (SATHLER *et al.*, 2009 – Apêndice 8.2). A haptoglobina (HP) é uma α 2-sialoglicoproteína plasmática, descoberta por

Polonovski e Jayle em 1938, cuja biossíntese ocorre principalmente no fígado, em resposta à secreção de algumas citocinas, como as interleucinas 1 e 6 (LANGLOIS e DELANGHE, 1996; YANO *et al*, 1998; SADRZADEH e BOZORGMEHR, 2004; VAN VLIERBERGHE *et al*, 2004).

A função principal da HP é se ligar à hemoglobina plasmática livre, advinda da destruição dos eritrócitos no interior dos vasos sanguíneos, prevenindo assim a excreção renal de ferro e protegendo os vasos dos seus efeitos oxidativos. A análise funcional da haptoglobina mostra ainda um efeito bacteriostático indireto, devido a indisponibilidade de ferro para bactérias dependentes e de imunomodulação (LANGLOIS e DELANGHE, 1996; WINTROBE, 1998; SADRZADEH e BOZORGMEHR, 2004, ETTRICH *et al*, 2002; THEILGAARD-MÖNCH *et al*, 2006). Além do sangue, esta proteína é encontrada em diferentes órgãos e células (pulmões, tecido adiposo, pele, baço, glândulas submaxilares, glândulas adrenais e útero), incluindo linhagens celulares de glioblastoma, astrócitos, e no cérebro de ratos após processo isquêmico (D'ARMIENTO *et al.*, 1997; OLSON *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

Em relação ao peso molecular, existem três tipos diferentes de HP incluindo a HP1-1 (72,8 KDa - dímero), HP2-1 (115,9 KDa - trímero e 159 KDa - tetrâmeros) e HP2-2 (172,4 KDa - tetrâmero) (**Figura 6**) (LANGLOIS e DELANGHE, 1996; TOLSON *et al.*, 2004).

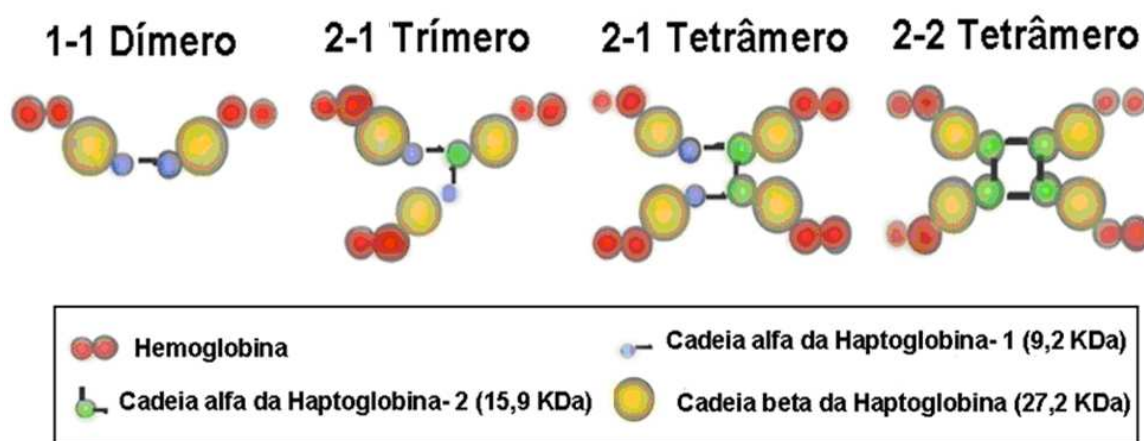


Figura 6: Representação esquemática das diferentes estruturas proteicas correspondentes aos fenótipos da Haptoglobina (Adaptado de TOLSON, 2004).

Segundo a literatura, cada monômero do dímero de HP é constituído por uma cadeia polipeptídica leve (α) e uma pesada (β), ligadas covalentemente por ligações dissulfeto ($^{\alpha}\text{Cys}^{90} - ^{\beta}\text{Cys}^{207}$) (YANO *et al.*, 1998, NIELSEN *et al.*, 2007). A cadeia leve possui similaridade com as proteínas controladoras do complemento (CCPs), também conhecidas como GP-Is ou domínios-Shushi (GABORIAUD *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2007; WICHER e FRIES, 2007). Diferentemente, a cadeia pesada da HP (PM=35kDa) formada por 245 resíduos de aminoácidos possui similaridade com as serino-proteases (NIELSEN *et al.*, 2007; WICHER e FRIES, 2007). Apesar desta similaridade, a HP não exibe atividade enzimática, visto que as posições dos resíduos correspondentes ao sítio de atividade proteolítica apresentam-se substituídos (Ser195Gly, Asp102Met, His57Ala) (GREER, 1981; GEORGE *et al.*, 2005).

Enquanto a cadeia pesada não apresenta nenhum polimorfismo genético, a cadeia leve 1, por sua vez, pode ainda ser classificada em α 1S (lenta) ou α 1F (rápida), conforme a mobilidade eletroforética. Estas cadeias se diferem nos aminoácidos das posições 52 e 53, sendo asparagina e ácido glutâmico em α 1S, e ácido aspártico e lisina em α 1F, decorrentes das substituições de base presentes no éxon 4 do gene HP1 (YANO *et al.*, 1998). As combinações entre esses alelos constituem 6 possíveis genótipos distintos e seus correspondentes fenótipos: HP1S-1S, HP1S-1F, HP1F-1F, HP2-1S, HP2-1F e HP2-2 (YANO *et al.*, 1998; ZACCARIOTTO *et al.*, 2006).

O resultado de cromatografia de afinidade utilizando a ecotina mutante RR, que permitiu identificar a interação deste inibidor com o dímero de haptoglobina, aparentemente estaria de acordo com o grau de similaridade observado da cadeia pesada da HP com as serino-proteases, já apontada pela literatura (SATHLER *et al.*, 2009 – Apêndice 8.2). De forma importante, a capacidade de inibição da ecotina mutante sobre o u-PA também foi testada e comprovada mesmo na presença da haptoglobina, o que sugere a formação de um complexo ternário, envolvendo interações entre o sítio primário da ecotina com o u-PA, e provavelmente seu sítio secundário com a HP (**Figura 7**) (SATHLER *et al.*, 2009 – Apêndice 8.2).

Estudos *in vivo* utilizando camundongos revelam que a ecotina pode ser encontrada até 14 horas após sua administração intravenosa, enquanto moléculas similares se mantêm na circulação, em mamíferos, por no máximo 30 minutos. Esta evidência indica uma interação desta molécula com proteínas plasmáticas,

provavelmente com a HP, que apresenta uma concentração média de 13mg/mL, e similaridade com serino-proteases. Este dado sugere que a HP possa servir como um reservatório ou uma proteína carreadora da ecotina no plasma, se ligando possivelmente através do sítio de ligação secundário (SATHLER *et al.*, 2009 – Apêndice 8.2).



Figura 7: Atividade enzimática do u-PA sobre substrato cromogênico na presença de ecotina RR (2 nM) e haptoglobina (2 μ M) (Adaptado de SATHLER *et al.*, 2009).

A similaridade estrutural apresentada entre a HP e as serino proteases comprovada experimentalmente por nosso grupo e o fato de que esta proteína não possui a estrutura tridimensional definida e/ou disponível no banco de dados de proteínas (“Protein Data Bank”), sugere que a modelagem molecular comparativa poderá contribuir efetivamente para o entendimento da interação da ecotina com essa proteína e indiretamente para a compreensão do comportamento farmacocinético deste inibidor quando utilizado *in vivo*. A determinação de aspectos estruturais e de interação pode ainda auxiliar na determinação da relação estrutura-atividade, através da construção de um modelo tridimensional para esse complexo ainda desconhecido (ETTRICH *et al.*, 2002; POLITICELLI *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Ecotina e infecção bacteriana

Atualmente tem se questionado a possibilidade de que inibidores de serino-proteases possam também ter um potencial antibacteriano, pela inibição de proteases utilizadas por bactérias no desenvolvimento da patogenicidade. Como citado nesta dissertação, algumas bactérias secretam SPATEs específicas, ou seja, serino-proteases que contribuem para o processo de crescimento bacteriano e

patogenicidade. Estas proteases são capazes de degradar proteínas do meio, liberando elementos fundamentais, como o íon ferro, que pode ser utilizado como co-fator enzimático, promovendo o desenvolvimento de cepas relacionadas e auxiliando a evolução de quadros patológicos (OTTO *et al.*, 2005; YEN *et al.*, 2008).

Sabendo que a ecotina é um potente inibidor de serino-proteases, a hipótese de que esta seja capaz de inibir a ação das SPATEs é factível. Neste caso, ao inibir este conjunto de serino-proteases de forma seletiva, a ecotina impediria a clivagem de proteínas que contém elementos essenciais para o crescimento da bactéria e desenvolvimento de sua patogenicidade, principalmente quando se considera uma questão de competitividade entre as bactérias. A não liberação e captação destes elementos gerariam um quadro de deficiência que afetaria o desenvolvimento destas bactérias competidoras (HENDERSON *et al.*, 2004). Tendo em vista o quadro de resistência bacteriana e a necessidade do desenvolvimento e identificação de novos antibióticos, a avaliação do potencial antibacteriano da ecotina se torna importante para as áreas de pesquisa e médica.

2.OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar estruturalmente a interação da ecotina e seus mutantes com a haptoglobina na forma dimérica (HP1), bem como o potencial antibacteriano deste inibidor

2.2 ESPECÍFICOS.

- Analisar as interações entre ecotina e seus mutantes com a haptoglobina na forma dimérica através da construção dos complexos ternários envolvendo a enzima ativadora de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) utilizando técnicas de modelagem molecular comparativa.
- Analisar experimentalmente o potencial antibacteriano da ecotina e seus mutantes frente a cepas Gram positivas e Gram negativas multiresistentes do Hospital Universitário Antonio Pedro da UFF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE TEÓRICA DAS INTERAÇÕES DO COMPLEXO ECOTINA-HAPTOGLOBINA

3.1.1. Construção do modelo da estrutura monomérica da haptoglobina-1 (HP1) contendo as cadeias leve (α) e pesada (β)

A sequência de resíduos de aminoácidos da haptoglobina-1-F (HP1) foi obtida no banco de dados de genes (GenBank) do National Center for Biotechnology Information (NCBI), (número de acesso X00637), sendo deduzida a partir da sequência de DNA humano. Inicialmente, utilizamos o programa Clustal W2 para realizar o alinhamento múltiplo de seqüências e determinar o grau de similaridade entre a HP1 e proteínas selecionadas a partir de dados da literatura (ALTSCHUL *et al*, 1997; ETTRICH *et al*, 2002; NIELSEN *et al*, 2007). Este alinhamento foi dividido em duas etapas, envolvendo as cadeias leve (α) e pesada (β) da HP1.

As proteínas para comparação com a cadeia leve da haptoglobina-1 (HP1 α) foram selecionadas na avaliação resultante do *Blastp* e incluíram o domínio catalítico do zimogênio da protease C1r do sistema complemento (cadeias A e B, PDB = gpza e gpzb), o domínio catalítico da protease ativa C1r do sistema complemento, (cadeia A, PDB = md8a), o domínio catalítico da protease C1s humana do sistema complemento (PDB = elva) e a Apolipoproteína - H (PDB = c1z). Para o alinhamento de sequência com a cadeia pesada da haptoglobina-1 (HP1 β), foram selecionados a elastase (PDB = brup), a tripsina (PDB = 1sgt), a quimase (PDB = 1pjp), a quimotripsina (PDB = 1cao), a trombina (PDB = 1a2c) e o fator X (PDB = 1c5m), com base no relato de Ettrich (2002) e Nielsen (2007).

Para a construção da HP1 α foram utilizados dois programas de modelagem molecular comparativa, a) o Swiss-Model (KIEFER *et al.*, 2009) para geração do modelo teórico utilizando como molde o domínio catalítico do zimogênio da protease C1r do sistema complemento (cadeia A, PDB = 1gpza), e b) o Deepview/Swiss-PDB Viewer Versão 4.0 (GUEx e PEITSCH, 1997) para conferência da sequência e

número de aminoácidos, interações permitidas e proibidas, formação de pontes dissulfeto, realizando-se ainda a otimização do modelo através do processo de minimização de energia que objetiva a diminuição de contatos desfavoráveis entre os resíduos do modelo, auxiliando a construção de uma estrutura tridimensional mais estável. Este programa permitiu ainda avaliar parâmetros como, mapa de potencial e cálculos de área e volume, produzindo uma análise do modelo através do alinhamento estrutural com o molde e outras proteínas, originando valores de Root Mean Square (RMS). A avaliação do modelo foi realizada utilizando o Procheck, que gera um gráfico de Ramachandran e expressa o quão favorável cada aminoácido está distribuído no espaço.

Para construção da cadeia pesada (β) foi utilizado o domínio catalítico da protease ativa C1r do sistema complemento (cadeia A, PDB = 1md8) como molde, seguindo o mesmo procedimento descrito para a cadeia leve. Para a obtenção do monômero da HP1, a interação das cadeias leve (α) e pesada (β) foi feita utilizando o programa Deepview/Swiss-PDB Viewer Versão 4.0, sendo sua orientação estabelecida utilizando o domínio catalítico do zimogênio da protease C1r do sistema complemento (cadeia A, PDB = 1gpza).

3.1.2 Construção da estrutura dimérica da haptoglobina-1 (HP1)

Dois monômeros de HP1 foram unidos utilizando o programa Deepview/Swiss-PDB Viewer Versão 4.0, com base nos parâmetros obtidos no molde de orientação (domínio catalítico do zimogênio da protease C1r do sistema complemento, PDB = 1gpz) e em dados de microscopia eletrônica citados por Ettrich (2002) incluindo orientação e distâncias de ligações para a construção do dímero HP1.

3.1.3 Construção e caracterização dos mutantes da ecotina

A estrutura cristal da ecotina monomérica (PDB = 1ecy) foi obtida no Protein Data Bank (PDB) e mutada utilizando o programa computacional Deepview/ Swiss-Pdb Viewer Versão 4.0. As posições Met⁸⁴ e Met⁸⁵ foram substituídas por arginina gerando o mutante RR e as posições Val⁸¹, Thr⁸³, Met⁸⁴, Met⁸⁵ e Asp⁷⁰ foram

substituídas respectivamente por treonina, serina, e arginina, gerando o mutante TSRR/R num total de dois mutantes. Em seguida os mutantes foram minimizados e analisados pelos parâmetros de valor da média quadrática (RMS), mapa de potencial eletrostático e volume. Os aminoácidos (Asp⁷⁰, Val⁸¹, Thr⁸³, Met⁸⁴ e Met⁸⁵) foram escolhidos com base nas regiões de interação entre ecotina e seus ligantes (TAKEUCHI comunicação pessoal).

3.1.4 Análise e validação dos modelos teóricos da HP1 e da ecotina

A análise de parâmetros como RMS, mapa de potencial e volume foram realizados no Deepview/Swiss-PDB Viewer Versão 4.0. O processo de validação foi realizado no programa Procheck, que utiliza o mapa de Ramachandran para qualificar a distribuição espacial dos aminoácidos do modelo avaliado, permitindo a sua correção e adequação. De acordo com o Procheck, o modelo obtido deve ter mais de 90% dos aminoácidos nas regiões favoráveis e nenhum nas regiões desfavoráveis. Entretanto, tendo em vista que os moldes utilizados já possuem uma pequena porcentagem de aminoácidos em regiões desfavoráveis, consideraremos os valores obtidos pelo modelo que possuírem equivalência com os valores do molde, como descrito por Abreu (ABREU, 2008).

3.1.5 Complexos teóricos ternários da ecotina e seus mutantes com a enzima ativadora de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) e a haptoglobina-1 (HP1)

Para a construção dos complexos utilizamos técnicas de modelagem molecular comparativa descritas por Castro e colaboradores em 2001 e selecionamos como molde, o cristal da ecotina mutante homodimérica (Tyr69Phe, Asp70Pro) ligada a tripsina II aniônica mutante de rato (Asp102Asn) (PDB = 1ezu) no banco de dados de estruturas protéicas - PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (BERNSTEIN *et al.*, 1977; ALTSCHUL *et al.*, 1990). O cristal foi selecionado devido a sua resolução (2,40 Å) e a presença da ecotina com alças completas, o que permitiu um melhor alinhamento do dímero haptoglobina-1 com a tripsina. Mutações pontuais (Met84Arg e Met85Arg) e (Val81Thr, Thr83Ser, Met84Arg, Met85Arg e Asp70Arg) foram realizadas diretamente na ecotina.

Para a construção do complexo ternário, alinhamos o modelo teórico do dímero da HP1 com uma das tripsinas II do complexo (já contendo as ecotinas mutantes) e o cristal da u-PA (PDB =1gja) com a outra tripsina no Deep View / Swiss-4.0 PDB Viewer.

Com o objetivo de minimizar contatos desfavoráveis entre os resíduos, os modelos construídos foram submetidos a etapas sucessivas de otimização da geometria usando o campo de força Gromos96, disponível no programa Deep View/Swiss-4.0 PDB Viewer (GUEX E PEITSCH, 1997). Em seguida, os modelos foram validados pela análise do gráfico de Ramachandran, usando o programa Procheck disponível no servidor PDBsum, bem como análise das interações do complexo como descrito por Castro *et al.*, 2001.

Para uma melhor visualização, os códigos do PDB relacionados as proteínas e seus complexos estão agrupados na tabela 3

Tabela 3: Relação entre dos códigos do PDB e suas respectivas proteínas e complexos

Código PDB	Proteínas
1gpza	Protease C1r do sistema complemento (domínio catalítico zimogênio) – cadeia A
1gpzb	Protease C1r do sistema complemento (domínio catalítico zimogênio) – cadeia B
1gpz	Protease C1r do sistema complemento (domínio catalítico zimogênio) – cadeia A e B
1md8a	Protease C1r do sistema complemento (domínio catalítico ativo) - cadeia A
1elva	Protease C1s humana do sistema complemento – cadeia A
c1za	Apolipoproteína - H
1bru	Elastase
1sgt	Tripsina
1pjp	Quimase
1cao	Quimotripsina
1a2c	Trombina
1c5m	Fator X
1ecy	Ecotina Monomérica
1gja	u-PA
1ezu	Complexo: Ecotina mutante homodimérica ligada a tripsina II aniônica mutante de rato

Fonte: Banco de dados de proteínas (PDB) - <http://www.pdb.org>

3.2 ANÁLISE EXPERIMENTAL DO PERFIL ANTIBACTERIANO DA ECOTINA

Para a verificação do potencial inibitório do crescimento bacteriano pela ecotina foram utilizadas 15 cepas bacterianas do Hospital Universitário Antônio Pedro incluindo cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* – 8380 e 8148; *S. aureus* – ORSA; *S. aureus* – ATCC; *S. epidermidis*; *S. epidermidis* - ORSE, *S. haemoliticus* – ORS e *Enterococcus faecalis*) e Gram negativas (*Serratia marcescens*; *Proteus mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterobacter cloacaceae*; *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* – 36571 e 635), sendo que cepas de *S. aureus* (8380 e 8148) e *E. coli* (36571 e 635) foram obtidas de pacientes diferentes.

Inicialmente as bactérias (uma colônia) foram semeadas em caldo contendo o meio Müller-Hinton, e incubadas na estufa (36,5 - 37°C) por tempo médio de 5 h. Em seguida, um inóculo (1 a 2×10^6 UFC/mL) das cepas bacterianas foi transferido através de um swab de algodão para placas contendo meio ágar Müller-Hinton (sólido).

A ecotina selvagem (WT) e suas formas mutantes RR (Met84Arg e Met85Arg) e TSRR/R (Val81Thr, Thr83Ser, Met84Arg, Met85Arg e Asp70Arg) foram adicionadas na concentração de 5,22 mg a discos de filtro WHATMAN tipo 3. Após, os discos foram colocados sobre o meio de cultura inoculado. As placas juntamente com os discos foram incubados durante 24h para crescimento (36,5 - 37°C) . Após este período, a formação dos halos de inibição de crescimento bacteriano foi analisada, medindo-se o diâmetro em mm com uma régua quando presentes.

As proteínas também foram avaliadas sendo adicionadas ao caldo Müller-Hinton contendo as cepas bacterianas, antes da inoculação destas no meio sólido. As placas foram submetidas ao processo de crescimento durante 5h seguindo as mesmas etapas do procedimento descrito anteriormente.

Os antibióticos de uso clínico (ciprofloxacina para cepas Gram-negativas - 2mg/mL e vancomicina para cepas Gram-positivas - 2mg/mL) foram usados conforme especificações do Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI) e água destilada (2µL) foi utilizada como controle negativo, em condições idênticas as usadas com a ecotina e seus mutantes.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE TEÓRICA DAS INTERAÇÕES DO COMPLEXO ECOTINA-HAPTOGLOBINA

4.1.1 Haptoglobina-1: Construção e avaliação comparativa das cadeias leve (α) e pesada (β)

A análise da sequência da HP1 obtida no Genbank revelou 347 resíduos de aminoácidos, sendo que os primeiros 102 aminoácidos formam o peptídeo sinal e a cadeia leve (α) e os 245 aminoácidos restantes formam a cadeia pesada (β) (**Figura 8**).

```
MSALGAVIALLLWGQLFAVDSGNDVTDIADDGCPKPPEIAHGYVEHSVRYQCKNYY
KLRTEGDGVYTLNDKKQWINKAVGDKLPECEAVCGKPKNPANPVQRILGGHLDK
GSFPWQAKMVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAKNLFNHNSENATAKDIAPTLTLYVGK
KQLVEIEKVVLPNYSQVDIGLIKQKQKVSVNERVMPICLPSKDYAEVGRVGYVSGW
GRNANFKFTDHLKYVMLPVADQDQCIRHYEGSTVPEKKTTPKSPVGVQPILNEHTFC
AGMSKYQEDTCYGDAGSAFAVHDLEEDTWYATGILSFDKSCAVAEYGVYVKVTSI
QDWVQKTIAEN
```

Figura 8: Estrutura primária da HP1 mostrando o peptídeo sinal (em verde) e as cadeias leve (α) (em vermelho) e pesada (β) (em azul).

O estudo comparativo da estrutura primária da cadeia leve (α) da HP1, resultante do alinhamento multisequencial, confirmou a existência de similaridade desta cadeia com a sequência da apolipoproteína – H (PDB = 1c1za) e das proteases do sistema complemento C1r (PDB = 1gpza) e C1s (PDB = 1elva) evidenciada pela conservação dos aminoácidos (19%, 29% e 33% de similaridade respectivamente) (**Figura 9 e Tabela 4**).

Na análise comparativa da estrutura primária da cadeia pesada (β) da HP1 também foi possível verificar a existência de similaridade com as sequências das proteases C1r, elastase, quimase, tripsina, quimotripsina, trombina e o fator de coagulação X, expressa pela conservação dos aminoácidos (similaridade = 21-33%) (**Figura 9 e Tabela 4**).

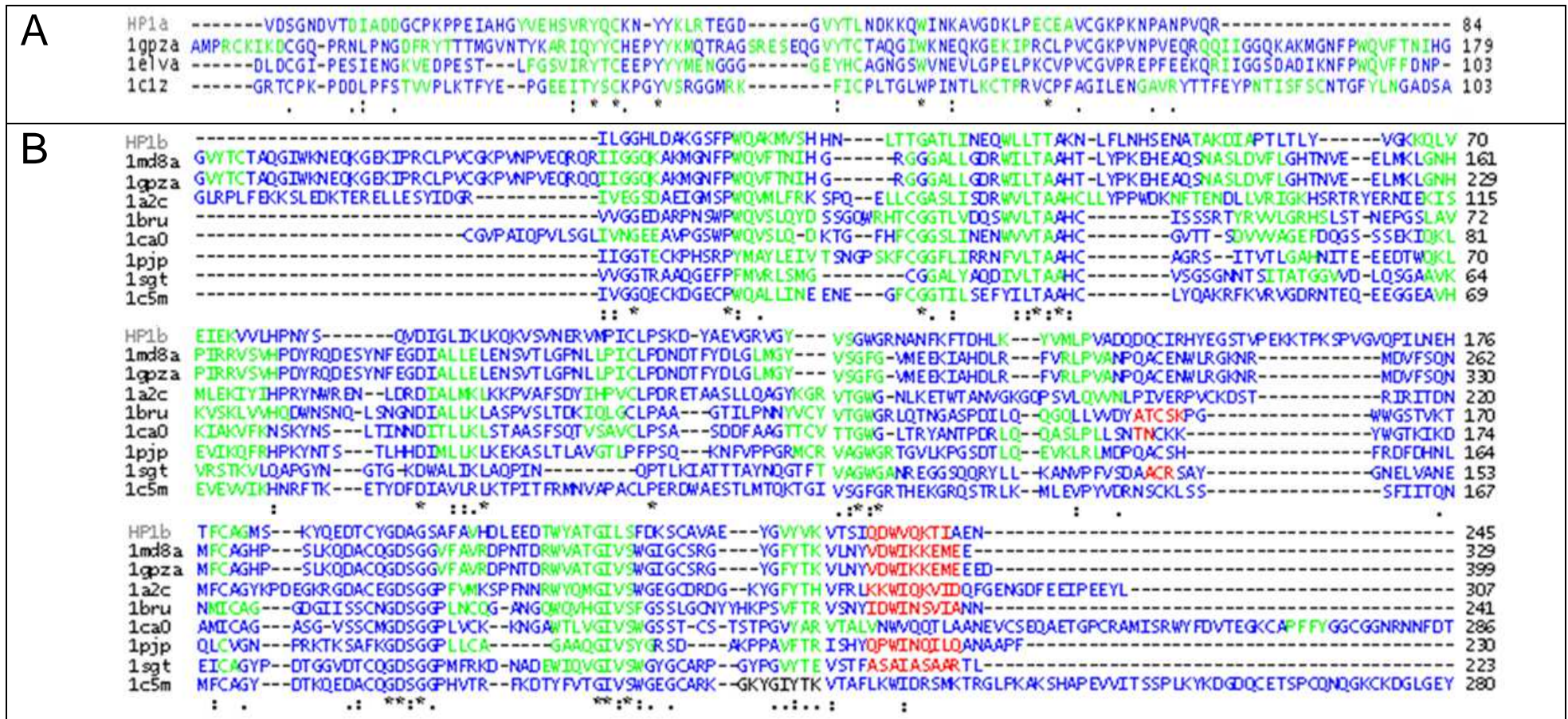


Figura 9: Alinhamento multiseqüencial das cadeias leve (**A**) e pesada (**B**) da haptoglobina-1 (HP1Fa e HP1Fb) com proteínas similares. Os aminoácidos marcados são os idênticos (*), os conservados (:), e os semiconservados (.). As proteínas comparadas foram as proteases do sistema do complemento C1r (domínio catalítico ativo - 1md8a e zimogênio - 1gpza) e C1s (1elva), a apolipoproteína - H (1c1za), quimotripsina (1ca0), elastase (1brup), quimase (1pjp), tripsina (1sgt), trombina (1a2c), fator X da coagulação (1c5m). As estruturas secundárias, α -hélice e β -pregueada estão em vermelho e verde, respectivamente. O preenchimento dos espaços entre seqüências para adequação do alinhamento é indicado por (-).

Tabela 4: Comparação do grau de similaridade entre a seqüência das cadeias leve (α) e pesada (β) da Haptoglobina-1 e de proteínas homólogas.

Cadeia	Nº de Aminoácidos	Proteína Homóloga	Código PDB	Nº de Aminoácidos	Similaridade (score) %
Leve	102	Protease C1s	1elva	333	33
		Protease C1r ^z	1gpza	399	29
		Apolipoproteína-H	1c1z	326	19
Pesada	245	Protease C1r ^z	1gpza	329	33
		Protease C1r ^a	1md8	329	33
		Fator X	1c5m	351	29
		Trombina	1a2c	307	29
		Elastase	1bru	241	26
		Quimotripsina	1ca0	295	25
		Quimase	1pjp	230	21
Tripsina	1sgt	223	21		

Protease C1r^z (domínio catalítico zimogênio)

Protease C1^a (domínio catalítico ativo)

Aparentemente a cadeia pesada é N-glicosilada em quatro sítios resíduos de asparagina (Asn²³, Asn⁴⁶, Asn⁵⁰ e Asn⁸⁰) (ETTRICH *et al.*, 2002). Ainda que possuindo similaridade com as serino-proteases, observa-se na HP1 que os resíduos do sítio catalítico (Ser¹⁹⁵, Asp¹⁰², His⁵⁷) são substituídos (Gly¹⁹⁵, Met¹⁰², Ala⁵⁷) (**Figura 9**). A haptoglobina contém ainda pontes dissulfeto intracadeia, as quais estão dispostas tanto nas cadeias pesadas (β Cys^{281 - 250} e β Cys^{292 - 322}), quanto nas leves (α Cys^{52 - 86}) (KUROSKY *et al.*, 1980; NIELSEN *et al.*, 2007).

A partir do estudo comparativo da estrutura primária e com base em dados da literatura (ETTRICH *et al.*, 2002; POLITICELLI *et al.*, 2008), os modelos teóricos das estruturas das cadeias leve (α) e pesada (β) da HP1 foram construídos no Swiss-Model, utilizando como molde as proteases C1r do sistema complemento (domínios catalítico zimogênio e ativo, PDB = 1gpza e 1md8a respectivamente), como descrito na seção Material e Métodos (**Figura 10**).

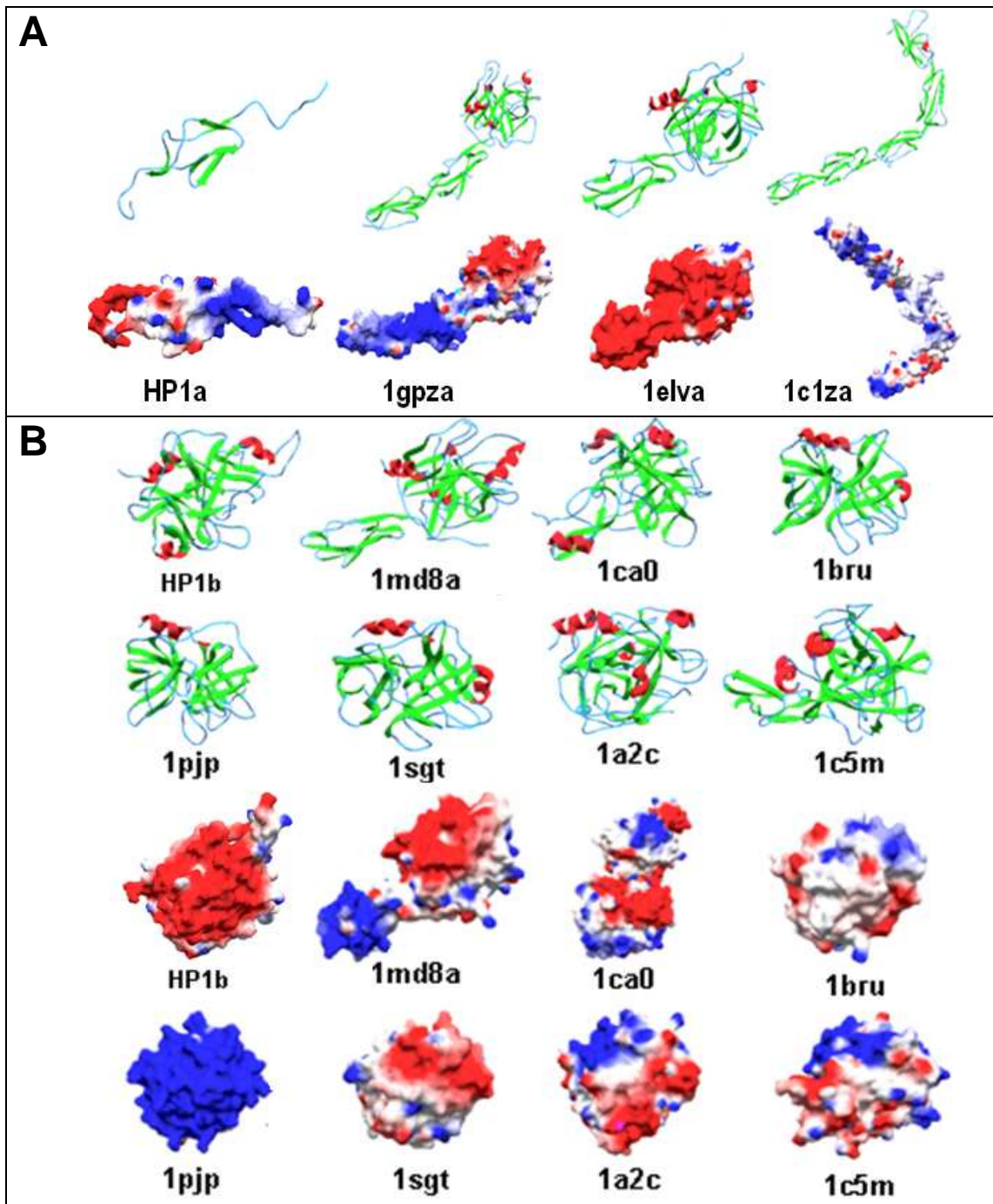


Figura 10: Comparação dos modelos das cadeias leve (**A**) e pesada da HP1 (**B**) com proteínas similares, incluindo proteases do sistema do complemento - C1r (domínio catalítico ativo - 1md8a e zimogênio - 1gpza) e C1s (1elva), a apolipoproteína-H (1c1za), quimotripsina (1ca0), elastase (1bru), quimase (1pjp), tripsina (1sgt), trombina (1a2c), fator X da coagulação (1c5m). Mostra-se a representação das estruturas secundárias (α -hélice - vermelho, β -pregueada - verde e alças - azul claro) e o mapa de potencial eletrostático com as regiões neutras em branco, carregadas positivamente em azul, e negativamente em vermelho.

O modelo teórico da cadeia leve da HP1 revelou uma estrutura secundária elipsoidal, não apresentando α -hélices, porém, contendo 6 estruturas β -pregueadas, de maneira análoga a conformação estrutural das proteínas do sistema complemento inicialmente estudadas (**Figura 10A**). Em contraste, o modelo teórico da cadeia pesada da HP1 conserva a forma globular observada nas serino-proteases, apresentando uma grande quantidade de estruturas β -pregueadas e algumas α -hélices (**Figura 10B**).

Outros parâmetros foram avaliados nos modelos das cadeias leve e pesada da HP1, como o mapa de potencial (**Figura 10**) e o valor da raiz média quadrática (RMS) determinado pelo alinhamento estrutural das cadeias da HP1 com as estruturas cristais das proteínas similares, definindo o grau de conservação estrutural dos modelos em relação às proteínas homólogas.

A análise do mapa de potencial eletrostático revelou que o modelo da cadeia leve da HP1 tem uma eletronegatividade significativa, com poucos sítios carregados positivamente; enquanto o modelo da cadeia pesada possui uma distribuição mais singular com regiões eletronegativas definidas, que ocupam grande parte desta subunidade e sítios eletropositivos que se distribuem entre os aminoácidos neutros (**Figura 10**).

O alinhamento estrutural da cadeia leve da HP1 com proteínas similares resultou em baixos valores de RMS (1gpza - 0,62 Å e 1elva - 1,05 Å), confirmando a conservação do enovelamento destas estruturas, com exceção da apoliproteína-H, cujo valor foi significativamente maior (2,21 Å) (**Figura 11a**).

Os valores obtidos na análise do RMS do modelo da cadeia pesada da HP1 comparada com proteases do sistema complemento, C1r - domínio catalítico zimogênio (1gpza) e ativo (1md8a) e serino-proteases avaliadas, elastase (1brup), quimase (1pjp), tripsina (1sgt), quimotripsina (1ca0), trombina (1a2c) e fator de coagulação X (1c5m) (0,57 Å - 1,10 Å) também foram compatíveis com a conservação do tipo β - β barril presente na estrutura 3D das mesmas (**Figura 11B**).

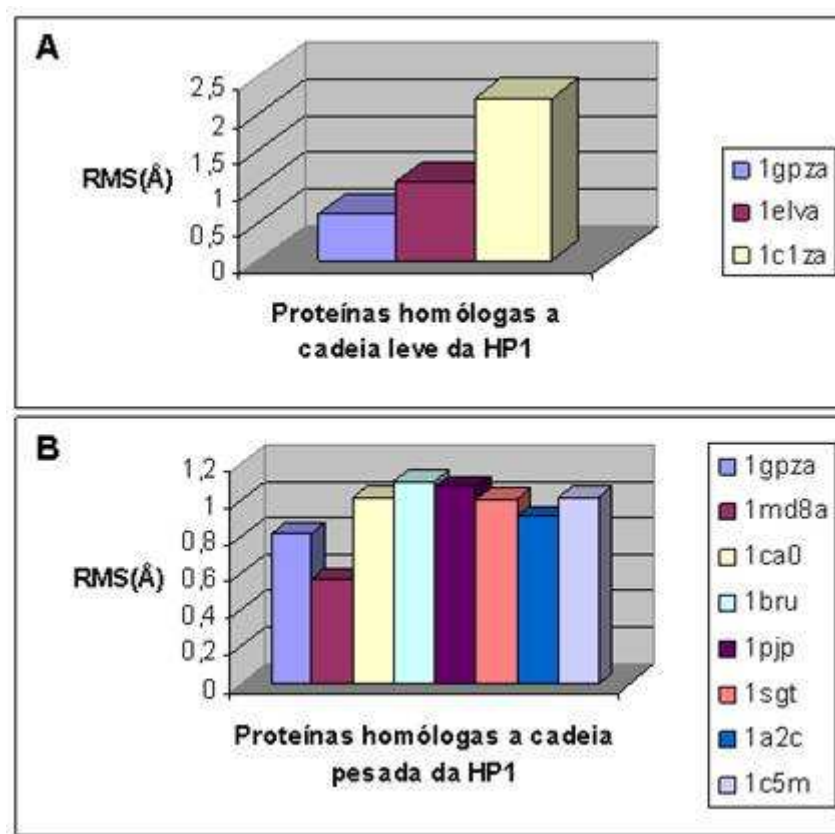


Figura 11: Comparação dos valores da media quadrática (RMS) resultantes do alinhamento estrutural das cadeias leve (**A**) e pesada (**B**) da HP1 com as proteínas similares incluindo proteases C1r - domínio catalítico zimogênio(1gpza) e ativo (1md8a) e C1s (1elva), apolipoproteína – H (1c1za), elastase (1brup), quimase (1pjp), tripsina (1sgt), quimotripsina (1ca0), trombina (1a2c) e fator de coagulação X (1c5m).

4.1.2 Haptoglobina-1 monomérica: Construção a partir dos modelos teóricos das cadeias e avaliação comparativa

Para a construção do modelo teórico do monômero de HP1, utilizamos a protease C1r do sistema complemento (1gpza) na orientação do alinhamento das cadeias leve (α) e pesada (β), como relatado por Nielsen e Polticelli (NIELSEN *et al*, 2007; POLTICELLI *et al*, 2008). Esta orientação permitiu o estabelecimento da ligação das pontes dissulfeto entre as cisteínas, que mantém a interação entre estas cadeias gerando um monômero de HP1 com área de 16151 \AA^2 e o volume de 42630 \AA^3 (Figura 12).

Os parâmetros de mapa de potencial (**Figura 12C**) e RMS (**Figura 12 D**) também foram avaliados para o modelo teórico da HP1 monomérica. Analisando o mapa de potencial verificou-se que esta molécula possui um perfil significativamente eletronegativo. Porém em diversas regiões é possível observar uma diferença neste padrão com sítios carregados eletropositivamente e neutros. Esta diferença é nitidamente expressa na cadeia pesada, onde em uma porção predominam aminoácidos carregados eletronegativamente e em outra adjacente, verifica-se a substituição deste caráter com aparecimento de regiões eletropositivas (**Figura 12**).

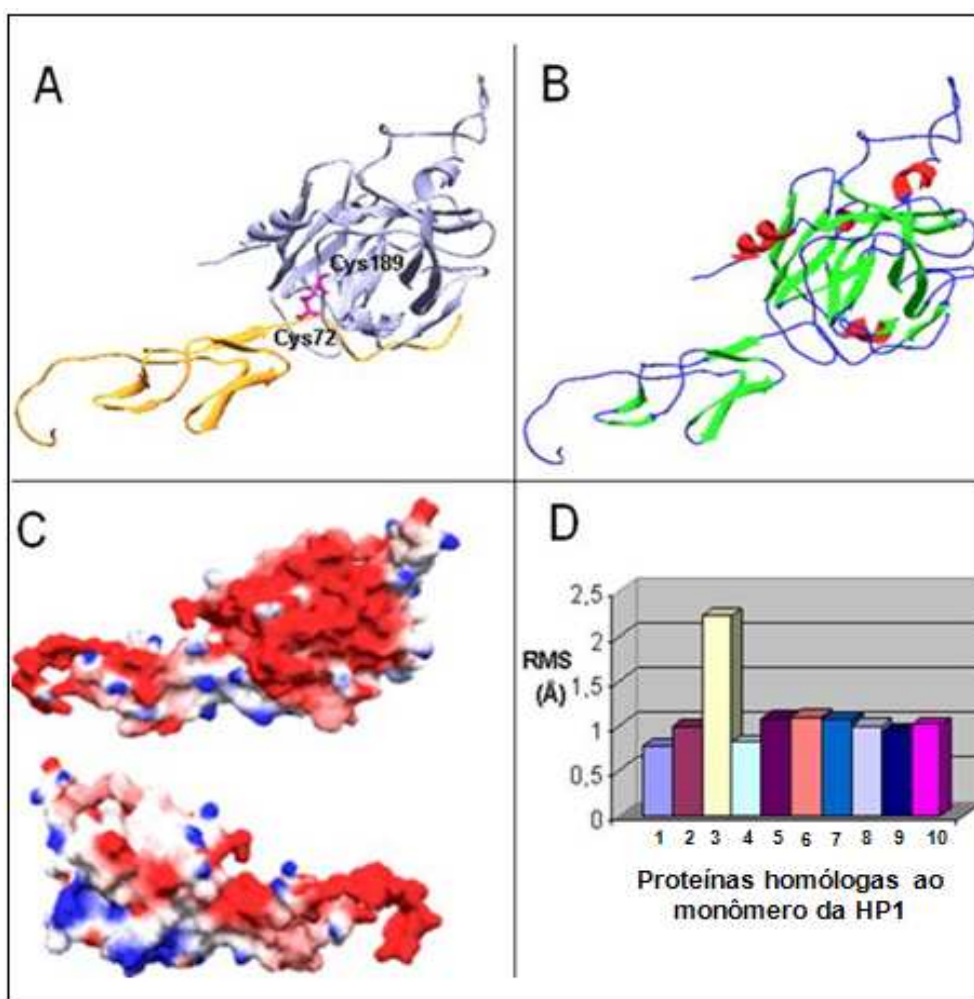


Figura 12: Modelo teórico monomérico final da HP1. **(A)** Cadeia leve (amarelo escuro) e pesada (lilás) ligadas por ponte dissulfeto (rosa) **(B)** Representação das estruturas secundárias - α -hélice em vermelho, β -pregueada em verde e alças em azul, **(C)** Mapa de potencial eletrostático, branco-regiões neutras, azul-regiões carregadas positivamente e vermelho-negativamente e **(D)** Comparação dos valores da raiz da média quadrática (RMS) resultantes do alinhamento estrutural do monômero de HP com proteínas similares incluindo as proteases c1r, domínio catalítico zimôgeno (1) e ativo (4) e c1s do sistema complemento (2), apolipoproteína – H (3), elastase (5), quimase (6), tripsina (7), quimotripsina (8), trombina (9) e fator de coagulação X(10).

Na análise comparativa com as proteínas similares, o modelo monomérico de HP1 apresentou baixos valores de RMS, indicando a conservação estrutural e similaridade no enovelamento característico das proteases do sistema complemento e serino-proteases, apesar da haptoglobina ser uma proteína de transporte e não uma enzima (0,78 Å - 1,10 Å) (**Figura 12D**).

A avaliação do modelo monomérico da HP1 utilizando o Procheck no programa PDBsum gerou o gráfico de Ramachandran, que permite a avaliação da posição dos aminoácidos na estrutura da proteína. O gráfico da HP1 mostra que o modelo apresenta 208 aminoácidos em regiões favoráveis (73,2%), 74 aminoácidos em áreas permitidas (25,3%), e apenas 4 aminoácidos (Ala⁶⁰, His¹³¹, Gln¹⁵² e Lys²¹⁴) em áreas proibidas, que correspondem a 1,4%, sendo estes valores próximos ao encontrado para o molde (**Figura 13**).

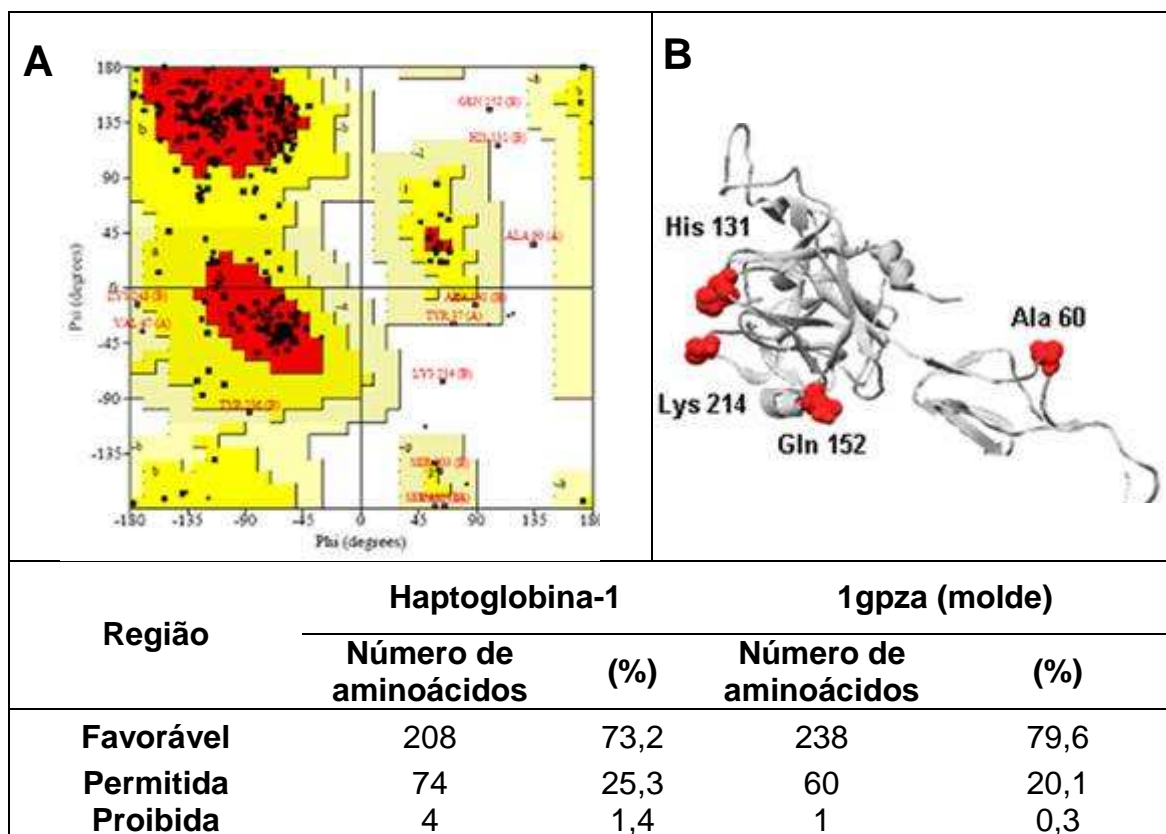


Figura 13: Validação do modelo monomérico de HP1 utilizando o gráfico de Ramachandran (**A**) para comparação da distribuição de aminoácidos nas áreas favorável (vermelho), permitida (amarelo) e proibida (branco) com a proteína molde, a protease C1r (1gpza). (**B**) A estrutura secundária do modelo mostra a localização dos quatro aminoácidos (vermelho) distribuídos em áreas proibidas de HP1.

4.1.3 Haptoglobina-1 dimerica: Construção e avaliação comparativa

O domínio catalítico do zimogênio da protease C1r do sistema complemento (PBD = 1gpz) serviu como molde de orientação para a construção do dímero da HP1, bem como, as informações de microscopia eletrônica que retratam a estrutura desta molécula, como descrito no Material e Métodos. O modelo gerado foi similar ao observado por Wejman (1984), que relatou o posicionamento antiparalelo do dímero da HP1. (**Figura 14**).

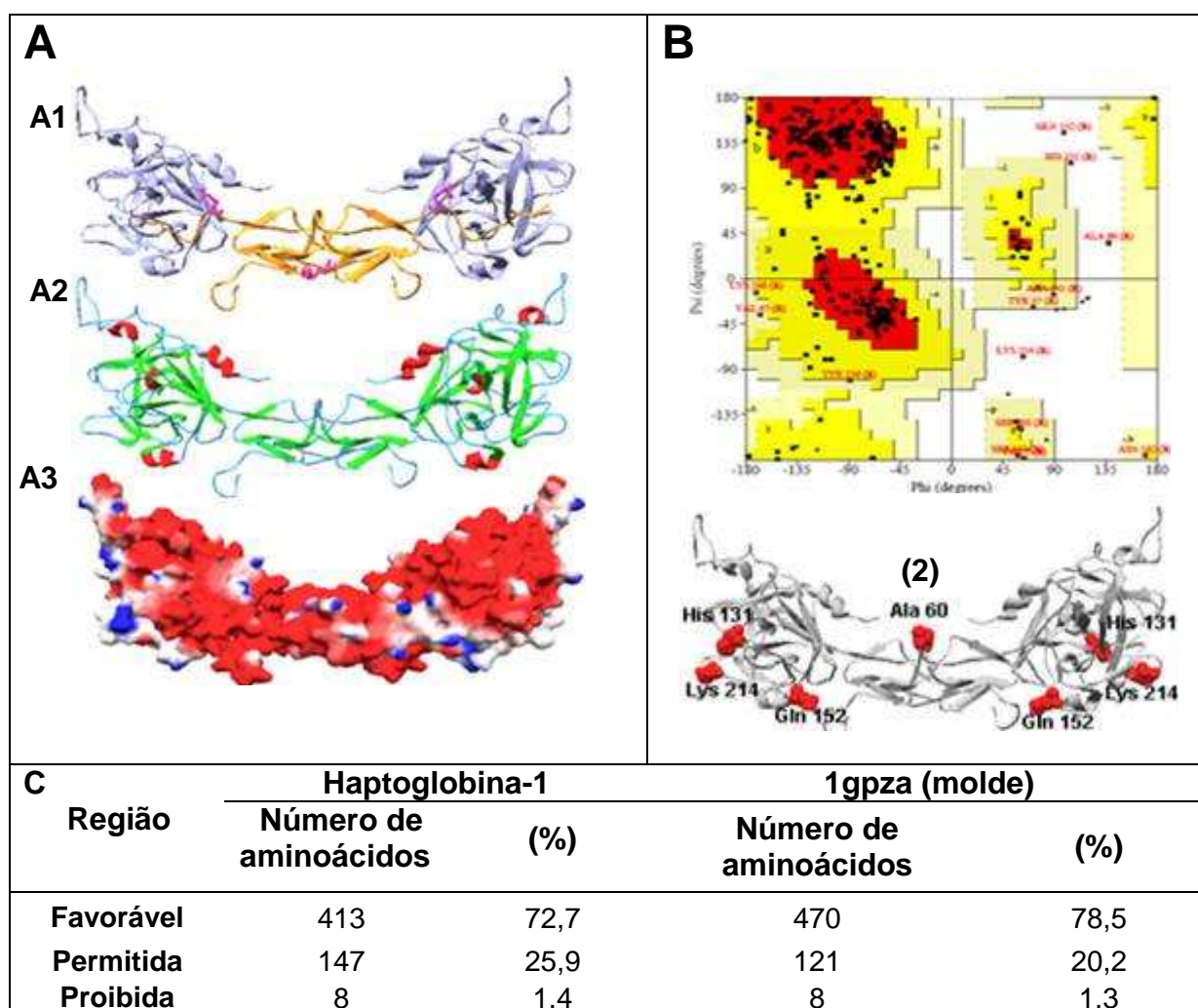


Figura 14: Modelo teórico da HP1 dimérica mostrando em **(A) A1** - a cadeia leve (amarelo escuro) e pesada (lilás) e pontes dissulfeto intercadeia (rosa); **A2** - as estruturas secundárias (α -hélices – vermelho, β -pregueadas – verde e alças - azul); **A3** - o mapa de potencial eletrostático (positivo – azul negativo – vermelho); em **(B e C)** o gráfico de Ramachandran, a comparação da distribuição de aminoácidos nas áreas favorável (vermelho) permitida (amarelo), e proibida (branco) com a proteína molde (1gpza) e localização dos oito aminoácidos (Ala⁶⁰, His¹³¹, Gln¹⁵² e Lys²¹⁴) dispostos igualmente em números de quatro em cada monômeros distribuídos em áreas proibidas(vermelho).

Através do Deepview/Swiss-PDB Viewer Versão 4.0 foi possível unir os dois monômeros com uma ligação dissulfeto entre suas cisteínas (Cys¹⁵) localizadas nas suas cadeias leves (**Figura 14**). O processo de validação efetuado com o programa Procheck revelou que 72.7% dos aminoácidos estavam em regiões favoráveis (413 aminoácidos), 25,9% em regiões permitidas (147 aminoácidos) e 1,4% (8 aminoácidos) em regiões proibidas de forma similar a proteína molde, a protease C1r (1gpza) (**Figura 14**). A união dos dois monômeros de HP1 para a geração da estrutura dimérica resultou em um aumento do caráter eletronegativo como mostra a análise do mapa de potencial do dímero da HP1(**Figura 14A**). Ainda de acordo com o mapa, é possível evidenciar pequenos sítios eletropositivos e neutros em regiões diversas (**Figura 14**).

4.1.4 Ecotina: Construção e caracterização dos mutantes

Os modelos teóricos das ecotinas mutantes RR (Met84Arg, Met85Arg) e TSRR/R (Val81Thr, Thr83Ser, Met84Arg, Met85Arg e Asp70Arg) se mostraram estáveis, com conservação das estruturas secundárias (6 folhas β -pregueadas) (**Figura 15A**).

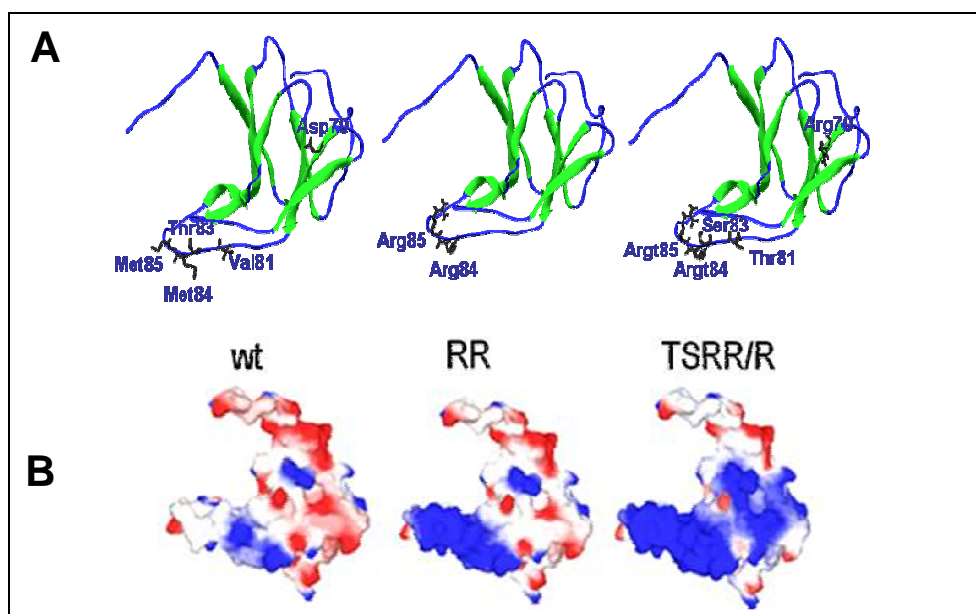


Figura 15: Comparação da ecotina selvagem (wt) com os modelos teóricos de seus mutantes (RR e TSRR/R) **(A)** Estrutura secundária (β -pregueada em verde), mostrando a localização dos aminoácidos substituídos. **(B)** Mapa de potencial mostrando regiões neutras (branco), carregadas positivamente (azul) e negativamente (vermelho).

Para ambos os mutantes, ocorreu um discreto aumento do volume (WT= 18259 Å³; RR =18339 Å³; TSRR/R = 18297 Å³), com desvio irrelevante no valor de RMS (RMS = 0,01 Å). Entretanto, a análise do mapa potencial eletrostático mostrou que ocorreram modificações significativas na distribuição eletrônica dos mutantes quando comparada ao tipo selvagem (**Figura 15B**). O aumento de eletropositividade pode ser claramente observado nas regiões onde os aminoácidos foram mutados, ou seja, os sítios P1 e P2, envolvidos no processo de interação da ecotina com outras proteínas.

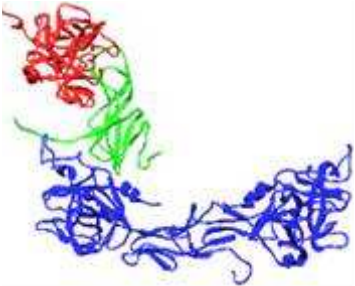
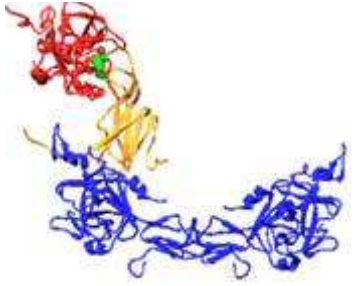
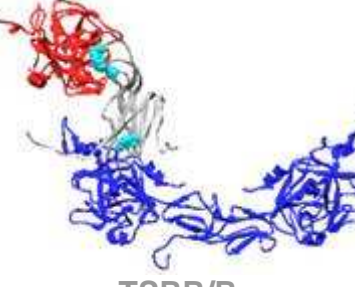
4.1.5 Complexos ternários da ecotina e seus mutantes com as proteínas u-PA e Haptoglobina

Para a construção dos complexos ternários formados pela enzima ativadora de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA), a ecotina (selvagem, mutante RR ou TSRR/R) e a haptoglobina - 1 (HP1), foi utilizado como molde o cristal da estrutura da ecotina mutante homodimérica (Tyr69Phe, Asp70Pro) ligada a tripsina II aniônica mutante de rato (Asp102Asn) (PDB = 1ezu). A partir deste molde, foram realizados alinhamentos estruturais para posicionar o modelo da haptoglobina-1 e da estrutura cristal da u-PA no complexo. Após a montagem e minimização destes complexos, observamos que se mantiveram estáveis com suas regiões de interação preservadas. A região de interface das ecotinas com o u-PA envolvendo o sítio primário do inibidor e o sítio catalítico da enzima formou um número maior de ligações e interações de contato (ex: ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas), do que a região de interação das ecotinas com o dímero de HP1 (**Tabela 5**).

De forma significativa, as mutações nos sítios primários e secundários de ligação da ecotina alteraram o número de interações observadas entre as moléculas envolvidas. A ecotina RR (M84R e M85R) por possuir mutação no sítio primário, mostra um aumento da região eletropositiva, sendo capaz de realizar um número maior de interações com u-PA do que em relação a ecotina selvagem (ex: Ligações de hidrogênio = $^{EcotRR}Arg^{85} - ^{u-PA}Asp^{228}$, e $^{EcotRR}Arg^{84}$ com $^{u-PA}Asp^{370}$, $^{u-PA}Ser^{371}$ e $^{u-PA}Gly^{399}$). Na ecotina TSRR/R, além das mutações no sítio primário, é possível observar que as substituições no sítio secundário resultaram em uma nova

distribuição das ligações de hidrogênio nesta região (ex: Arg⁷⁰ da ecotina TSRR/R e a His²⁶⁰ da HP1) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Comparação dos modelos ternários formados por u-PA (vermelho), HP1 (azul), Ecotina selvagem (verde) e suas formas mutantes RR (laranja) e TSRR/R (cinza) e das ligações de hidrogênio observadas. O número (2) indica a presença de duas interações.

Ecotina	Alvo de interação	
	u-PA	HP1
 <p>Selvagem</p>	<p>Gln₃₇₃ - Asp₄₉ Thr₂₆₉ - Leu₅₅ Gly₃₇₄ - Met₈₄ Ser₃₇₆ - Met₈₄ (2) Val₂₀₈ - Ala₈₆</p>	<p>Asp₃₂₀ - Gly₆₆ His₁₆₂ - Trp₆₇ Pro₁₆₃ - Asn₁₁₀</p>
 <p>RR</p>	<p>Gln₃₇₃ - Asp₄₉ Thr₂₆₉ - Leu₅₅ Gly₃₇₄ - Arg₈₄ Ser₃₇₆ - Arg₈₄ (2) Val₂₀₈ - Ala₈₆ Asp₃₇₀ - Arg₈₄ (2) Ser₃₇₁ - Arg₈₄ Gly₃₉₉ - Arg₈₄ Asp₂₂₈ - Arg₈₅</p>	<p>Asp₃₂₀ - Gly₆₆ His₁₆₂ - Trp₆₇ Pro₁₆₃ - Asn₁₁₀</p>
 <p>TSRR/R</p>	<p>Gln₃₇₃ - Asp₄₉ Thr₂₆₉ - Leu₅₅ Gly₃₇₄ - Arg₈₄ Ser₃₇₆ - Arg₈₄ (2) Val₂₀₈ - Ala₈₆ Asp₃₇₀ - Arg₈₄ (2) Ser₃₇₁ - Arg₈₄ Gly₃₉₉ - Arg₈₄ Asp₂₂₈ - Arg₈₅</p>	<p>Asp₃₂₀ - Gly₆₆ His₁₆₂ - Trp₆₇ Pro₁₆₃ - Asn₁₁₀ His₂₆₀ - Arg₇₀</p>

Os modelos teóricos dos complexos ternários indicam que o dímero de HP1 é capaz de se ligar ao monômero de ecotina e de suas formas mutantes, através do sítio secundário, formando ligações de hidrogênio ($^{HP1}Asp^{320} - ^{Ecot}Gly^{66}$, $^{HP1}His^{162} - ^{Ecot}Trp^{67}$ e $^{HP1}Asn^{110} - ^{Ecot}Pro^{163}$) (Selvagem: 3, RR: 3 e TSRR/R: 4) e também, diversas outras interações de contato incluindo hidrofóbicas e de van der Waals (Selvagem: 67, RR: 67 e TSRR/R: 73). Nestes complexos ainda verificamos que a ligação da u-PA com a ecotina e com suas formas mutantes é realizada pelo sítio primário, sendo notadas também várias ligações de hidrogênio como: $^{u-PA}Gln^{373} - ^{Ecot}Asp^{49}$ (Selvagem: 6, RR: 11 e TSRR/R: 11) (**Tabela 4**) e também interações de contato incluindo as hidrofóbicas e van der Waals (Selvagem: 154, RR: 162, TSRR/R: 155).

4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA ECOTINA E SEUS MUTANTES SOBRE CEPAS MULTIRESISTENTES

O efeito da ecotina selvagem (WT) e seus mutantes (RR e TSRR/R) no crescimento bacteriano foi analisado utilizando duas metodologias na qual as proteínas (5mg) foram (1) adicionadas em disco de filtro e distribuídas em meio contendo as diferentes cepas; ou (2) inoculadas diretamente no meio de cultura (caldo Müller-Hinton) contendo as cepas, como descrito no material e métodos,.

De acordo com a tabela 5, a ecotina e seus mutantes não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano das 15 diferentes cepas. Em contraste, este crescimento foi inibido pela adição de ciprofloxacina (2mg/mL) e vancomicina (2mg/mL) que são antibióticos conhecidos com eficiência frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente em contraste com a água destilada, que não interfere no crescimento bacteriano (**Tabela 6**).

Tabela 6: Comparação do efeito da ecotina selvagem e seus mutantes (2,5 mg/mL) no crescimento bacteriano utilizando discos de difusão (Halo em mm) ou incubação direta com a cultura líquida (inibição do crescimento = IC em %). Os resultados expressam a média \pm S.D de 3 experimentos individuais.

ID	Cepas Bacterianas	Halo (mm)				IC(%)
		Ecotina em Discos	Ciprofloxacina	Vancomicina	Água destilada	Ecotina em Meio-Líquido
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	15	0	0
2	<i>Staphylococcus aureus</i> 8380	0	0	16	0	0
3	<i>Staphylococcus aureus</i> 8148	0	0	16	0	0
4	<i>Staphylococcus aureus</i> (ORSA)	0	0	16	0	0
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 201	0	0	16	0	0
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 8126	0	0	16	0	0
7	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ORS)	0	0	16	0	0
8	<i>Staphylococcus haemoliticus</i> (ORSA)	0	0	16	0	0
9	<i>Serratia marcescens</i> 204	0	26	0	0	0
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 36408	0	26	0	0	0
11	<i>Enterobacter cloacaceae</i> 406	0	27	0	0	0
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 6891	0	26	0	0	0
13	<i>Proteus mirabilis</i> 464	0	39	0	0	0
14	<i>Escherichia coli</i> 635	0	25	0	0	0
15	<i>Escherichia coli</i> 36571	0	25	0	0	0

5. DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE TEÓRICA DA INTERAÇÃO DA ECOTINA E SEUS MUTANTES COM O DÍMERO DA HAPTOGLOBINA-1 UTILIZANDO TÉCNICAS DE MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA.

A ecotina é um inibidor de serino-proteases encontrado no periplasma da bactéria *Escherichia coli*, que pode se apresentar sob a forma monomérica ou dimérica, de acordo com sua concentração em solução (nM e μ M, respectivamente) (CASTRO *et al.*, 2006; SATHLER *et al.*, 2009). Este inibidor possui na posição P1 a metionina 84, que modula a sua afinidade, sem interferir em sua especificidade (LASKOWISKY e KATO, 1980; MCGRATH *et al.*, 1994). A estrutura dimérica da ecotina é mantida pela interação entre as porções C-terminais, possibilitando a ligação de duas moléculas de enzima por lados opostos, estabelecendo assim, o processo de inibição (PAL *et al.*, 1996 e SHIN *et al.*, 1996).

Estudos realizados pelo nosso laboratório em conjunto com o Dr. Charles Craik na Universidade da Califórnia em São Francisco mostraram que este inibidor é capaz de se ligar a haptoglobina (HP1). Com base nesse resultado experimental, o presente trabalho procurou identificar interações envolvendo a ecotina e essa proteína plasmática que apresenta estrutura similar a tripsina, porém com funções divergentes (SATHLER *et al.*, 2009 – Apêndice 8.2).

A haptoglobina (HP) é uma α -sialoglicoproteína plasmática de grande importância nos processos fisiológicos do organismo humano, sendo capaz de interagir com diversas proteínas. A concentração sérica da Haptoglobina muda durante a vida, sendo menor em recém-nascidos do que em indivíduos adultos saudáveis (concentrações entre 30 e 200 mg/dL). Sua vida média no plasma é de, aproximadamente, cinco dias (LANGLOIS e DELANGHE, 1996). A Haptoglobina é também uma proteína de fase aguda, com propriedades imunomodulatórias que podem ser inibitórias ou estimulatórias da resposta imune (WASSEL, 2000; VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2004). Mudanças em sua concentração podem ajudar na avaliação do “status” da doença de pacientes com inflamações, infecções ou processos tumorais, uma vez que, nestes casos, a concentração sérica desta proteína encontra-se elevada. O nível da HP também permite avaliar a ocorrência

de episódios hemolíticos recentes quando, por aumento de consumo, as concentrações encontram-se diminuídas (LANGLOIS e DELANGHE, 1996; DOBRYSZYCKA, 1997).

Desde a descoberta da haptoglobina por Polonovski e Jayle (1938) diversos grupos de pesquisa têm buscado a elucidação de características estruturais e funcionais desta proteína, proporcionando assim, um maior entendimento acerca do tema estrutura-função. Porém, até hoje, a estrutura tridimensional da HP1 não foi determinada experimentalmente, seja por cristalografia ou por ressonância magnética nuclear, fazendo com que muitos pesquisadores direcionem suas linhas de pesquisa na tentativa de obter o modelo estrutural da HP1 (ETTRICH *et al.*, 2002; POLTICELLI *et al.*, 2008).

A identificação e caracterização do cDNA da HP1 por Yang e colaboradores (1983) foi um grande passo para a posterior compreensão de sua estrutura tridimensional, vindo confirmar os trabalhos de Kurosky e colaboradores (1974; 1980). Essa identificação mostrava a similaridade estrutural existente entre a HP1 e serino-proteases. Com o advento da bioinformática e consolidação da modelagem comparativa, modelos otimizados foram sendo construídos. Em 2000, Ettrich e colaboradores relataram um modelo da estrutura tridimensional do monômero e dímero da HP1, cujos dados utilizamos para direcionar nossos estudos. Através da análise comparativa da estrutura primária da cadeia leve (α) da haptoglobina-1 (HP1a) foi possível confirmar a similaridade desta cadeia com as proteases C1r e C1s do complemento e com a apolipoproteína-H, auxiliando assim a construção do modelo.

A avaliação inicial no programa Clustal W2 indicou a protease C1s como melhor molde (maior "score"), que também fora utilizado na construção de um modelo recentemente descrito por Polticelli e colaboradores (2008). O nosso modelo teórico da HP1a possui forma elipsoidal e não contém α -hélices, apresentando uma conformação estrutural análoga a das proteínas do sistema complemento avaliadas e de forma similar ao observado por Ettrich e colaboradores (2002).

Em 2007, Nielsen e colaboradores avaliaram interações da haptoglobina com o receptor CD163 de macrófagos (NIELSEN *et al.*, 2007). Neste estudo, o grau de similaridade entre a haptoglobina e as serino-proteases foi novamente observada, revelando uma similaridade (21% - 33%) da cadeia pesada da HP1 com as

estruturas da elastase, quimase, tripsina, quimotripsina, protease C1r do complemento, trombina e fator X da coagulação. Estes resultados corroboraram com os dados obtidos pelo nosso grupo mostrados nesta dissertação. O modelo teórico aqui desenvolvido da HP1b gerado à partir da estrutura cristal da protease C1r utilizando o programa Swiss-Model e baseado nos dados de Polticelli e colaboradores (2008) apresentou uma estrutura estável, globular e formada por regiões β -pregueadas e α -hélices. Este modelo é similar a estrutura padrão das serino-proteases (β - β barril), excetuando os resíduos do sítio catalítico que estão ausentes na HP1, estrutura também observada por Ettrich e colaboradores (2002).

A orientação da montagem do monômero completo da HP1 foi realizada de acordo com a proposta de Polticelli e colaboradores (2008), utilizando a protease C1r, permitindo assim, a construção de uma estrutura estável. Analisando o grau de conservação e similaridade do enovelamento do monômero da HP1, construído neste trabalho, com a protease de C1r é possível verificar que o RMS observado entre o modelo teórico e a referida proteína é de 0,78 Å, confirmando assim essa conservação estrutural, similar a observada por Tosi e colaboradores (1989). De forma importante Ettrich e colaboradores (2002), mostraram a menor similaridade observada entre a haptoglobina e a apolipoproteína-H, que também foi detectada em nossos experimentos teóricos (RMS = 2,22 Å). Essa diferença provavelmente é justificada pela presença da porção lipídica existente nesta molécula.

Os valores de RMS entre as serino-proteases avaliadas e o monômero de HP1 foram compatíveis com a conservação estrutural do tipo β - β barril nestas proteínas, como enfatiza Di Cera (2009). Esta conservação estrutural já foi considerada em um dos primeiros modelos da HP1b proposto por Greer (1980), bem como em um modelo recente da HP1 monomérica desenvolvida, utilizando-se técnicas de modelagem molecular (NIELSEN *et al.*, 2007).

No processo de validação do monômero de HP1 foram vistos quatro resíduos aminoácidos dispostos em regiões desfavoráveis estando posicionados em pontos altamente flexíveis da molécula e que, aparentemente não fazem parte de nenhuma região de interação desta molécula conhecida até então.

Um dos primeiros modelos por homologia do dímero da haptoglobina foi construído por Ettrich e colaboradores (2002). Utilizando este modelo como base, direcionamos a construção da estrutura dimérica da HP1 através de duas etapas específicas, iniciando pelo alinhamento estrutural dos monômeros de HP1 com a

estrutura cristal do dímero da protease de C1r. Este molde orientou a montagem do dímero dispondo os monômeros em uma posição antiparalela, assim como enfocado por Polticelli e colaboradores (2008). Posteriormente, alterações das distâncias e angulações entre os monômeros de HP1 foram realizadas utilizando os parâmetros de microscopia eletrônica (WEJMAN *et al.*, 1984). O grande desafio neste processo que era alinhar os dois monômeros da HP1, para estabelecer uma ligação dissulfídica entre as cisteínas nas posições 15 presentes nas cadeias leves (α) o foi atingido. O processo de otimização e validação resultou em um modelo do dímero estável com a conservação de sua estrutura e ligações similar a Wejman e colaboradores.

Atualmente a ecotina e seus mutantes têm sido testados em animais e em vários sistemas biológicos a fim de identificar sua capacidade inibitória sobre doenças e outros processos fisiológicos. Esses inibidores têm mostrado uma eficiência significativa na inibição de processos como a invasão e metástase por células cancerosas e a involução mamária em mamíferos, mostrando desta forma que estes inibidores podem servir como uma ferramenta para o direcionamento de futuras linhas de estudos no desenvolvimento de protótipos e de medicamentos (TAKEUCHI *et al.*, 1999; SELVARAJAN *et al.*, 2001; STOOP e CRAIK, 2003; DÉSILETS *et al.*, 2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas na tentativa de compreender melhor a ecotina e outros inibidores de serino-protease, nas quais se destacam a clonagem e a expressão recombinante (ERPEL *et al.*, 1992; MCGRATH *et al.*, 1991a,b; ZHUA *et al.*, 2006). Nos estudos de Wang e colaboradores (1995), as técnicas de mutação sítio-dirigida foram usadas para elucidar a relação estrutura-atividade da ecotina, bem como seu mecanismo de ligação na enzima alvo. Nestes experimentos, deleções e substituições no sítio primário e no sítio secundário da ecotina geraram mutantes com diferentes potências e especificidades. (YANG *et al.*, 1998; LABOISSIERE *et al.*, 2002; EGGERS *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2006).

No presente estudo utilizamos a modelagem molecular comparativa para criar e avaliar mutantes teóricos da ecotina (RR - M84R e M85R e TSRR/R - V81T, T83S, M84R, M85R e D70R) visando observar alterações relevantes que pudessem influenciar na ação biológica desta proteína, podendo assim auxiliar no desenho de mutantes mais potentes. Assim, os mutantes teóricos da ecotina se mostraram

estáveis, com conservação das estruturas secundárias (6 folhas β -pregueada), apresentando modificações significativas na distribuição eletrônica quando comparados ao tipo selvagem, no sentido de um aumento de eletropositividade nas regiões de interação (P1 e P2), bem como aumento de volume, o que justificaria a melhor eficiência de inibição apresentada por eles, evidenciada pelo aumento da afinidade (WANG *et al.*, 1995).

5.1.1 Complexos ternários da ecotina com a haptoglobina e a enzima ativadora de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA)

Em 1982, Arcoleo e Greer desenvolveram diversos estudos sobre o complexo hemoglobina-haptoglobina, enfocando-se a existência de sítios específicos de interação, que na haptoglobina se localizam na cadeia pesada (β) em uma região que compreende a alça 128-137. A interação da haptoglobina com receptores específicos, como o CD163 foi analisada por Nielson e colaboradores (2007), que apontaram a alça Val²⁵⁹, Glu²⁶¹, Lys²⁶² e Thr²⁶⁴, presente na cadeia pesada (β), como responsável por esta interação (**Figura 16**).

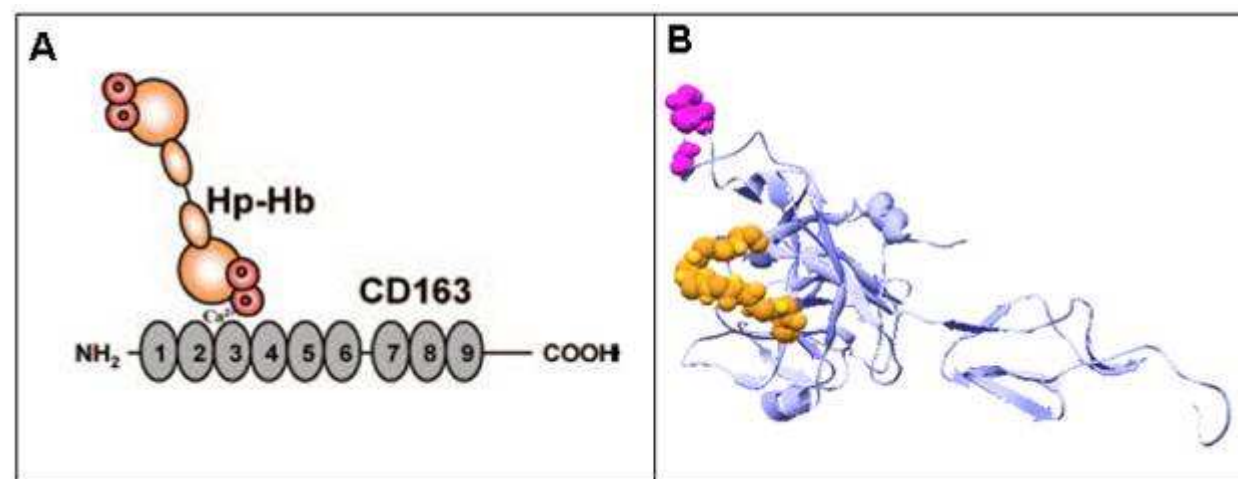


Figura 16: (A) Modelo esquemático da interação entre o complexo hemoglobina-haptoglobina e o receptor de CD163 (Adaptado de MADSEN *et al.*, 2004) e (B) nosso modelo teórico da HP1 (lilás) mostrando os resíduos de aminoácidos que são envolvidos nas interações com hemoglobina (amarelo escuro) e receptor CD163 (rosa).

Recentemente nosso grupo evidenciou a interação da HP1 com a ecotina sendo apontado como possível sítio de interação a cadeia pesada (β) (SATHLER *et al.*, 2009 - – Apêndice 8.2). Através da análise do mapa de potencial eletrostático, podemos observar que apesar do dímero de HP1 possuir em sua maioria regiões eletronegativas, é possível evidenciar perfis eletrostáticos característicos em regiões variadas. Isto sugere que a interação desta proteína com outras moléculas podem ser direcionada tanto pela complementaridade conformacional quanto pela complementaridade de cargas, o que aponta para uma seletividade específica conduzida pelas diferenças eletrostáticas e conformacionais em cada região da HP1.

A ecotina pode ser encontrada na circulação até 12-14h horas após sua administração por via intravenosa, diferentemente do padrão de proteínas de massa molecular similar que é cerca de 30 min na circulação (SATHLER *et al.*, 2009 - Apêndice 8.2). Esta elevada permanência da ecotina provavelmente se dê em virtude de sua ligação com proteínas plasmáticas, por exemplo a haptoglobina. Neste caso, a interação poderia ocorrer pelo sítio secundário da ecotina, sendo que mutações neste sítio tenderiam a aumentar o número de interações da ecotina com a HP1, bem como sua afinidade. A partir destes dados é possível inferir que a haptoglobina possa servir como um reservatório ou uma proteína carreadora da ecotina no plasma.

Com base nessa premissa, inicialmente poderia se racionalizar a hipótese para a formação do complexo na qual a haptoglobina se ligaria ao sítio primário (P1) da ecotina. Contudo isso seria refutado por dois fatores, a) HP1 não possui a tríade catalítica, o que condicionaria a um impedimento estérico, impossibilitando a ligação com a ecotina (GREER, 1981) e b) o experimento de inibição enzimática descrito por nosso grupo, no qual foi observada a capacidade de inibição de um mutante da ecotina (ecotina Met84Arg, Met85Arg) sobre o u-PA mesmo na presença da haptoglobina (SATHLER *et al.*, 2009 – Apêndice 8.2). Esse resultado indica, portanto, que o sítio P1 não estaria livre para a ligação com a haptoglobina. Assim é possível inferir que a região envolvida na interação da ecotina com a haptoglobina seja o sítio secundário desse inibidor.

Em 1995, Wang e colaboradores, mostraram que a ecotina selvagem tem menor afinidade com o u-PA do que seu mutante Met84Arg, Met85Arg (WANG *et*

al., 1995); enquanto Selvarajan e colaboradores em 2001 confirmaram que tal mutante é capaz de inibir de maneira mais efetiva o u-PA em concentrações nanomolares. Com base nesses resultados e nos nossos dados experimentais foi possível inferir que o u-PA estaria ligado no sítio primário tanto da ecotina selvagem quanto dos seus mutantes (RR e TSRR), porém provavelmente com uma afinidade diferenciada em cada complexo. Tendo em vista que em concentrações nanomolares, a ecotina se encontra sob a forma monomérica (CASTRO *et al.*, 2006), e que em nossos experimentos de inibição, utilizamos concentrações nM de ecotina, construímos o complexo teórico com a ecotina na forma monomérica (SATHLER *et al.*, 2009 – Apêndice 8.2). Assim a construção do complexo da ecotina e seus mutantes com o u-PA e a haptoglobina (forma dimérica) foi realizada, observando-se a ligação do u-PA ao sítio primário da ecotina e da haptoglobina ao sítio secundário, utilizando para isso os dados relatados por Laboissiere e colaboradores, que analisaram a interface de interações entre o u-PA e a ecotina (LABOISSIERE *et al.*, 2002),

Em relação a análise das interações foi possível observar que nos três complexos gerados com a ecotina do tipo selvagem e os dois mutantes, o sítio primário possui um número maior de interações do que o sítio secundário, independente das mutações apresentadas pela ecotina. De acordo com Yang e colaboradores(1998), o sítio primário da ecotina concentra duas alças de extrema importância para a função desta proteína, a primeiro é a alça 80, também chamado como “loop” reativo e o segundo é a alça 50. Estas duas alças se ligam ao sítio ativo da protease gerando diversas de interações, No sítio secundário estão envolvidos também as alças 60 e 100, os quais se ligam a região C-terminal da protease, apresentando um número reduzido de interações em relação ao sítio primário, apesar de ser um elemento chave no reconhecimento de macromoléculas (YANG *et al.*, 1998). Desta forma, o maior número de ligações observadas na região do complexo que compreende o sítio primário da ecotina se dá em virtude da complementaridade estrutural e eletrostática entre a ecotina e o u-PA, havendo assim o bloqueio da tríade catalítica da enzima. Por outro lado, a interação evidenciada na região do complexo que compreende o sítio secundário da ecotina, gera um padrão reduzido de ligações entre a ecotina e a haptoglobina. Por conta destas diferenças de interação, podemos inferir que a afinidade observada entre a

ecotina e o u-PA é maior do que entre a ecotina a haptoglobina, justificando a atividade inalterada deste inibidor, mesmo se ligado a HP-1.

De forma individualizada, observa-se ainda com a avaliação dos complexos ternários, que as mutações influenciam diretamente o número de interações de cada sítio separadamente, confirmando os dados propostos por Wang e colaboradores (1995) que observaram essa modulação. A análise comparativa entre os complexos mostrou que a região primária do complexo que apresenta o monômero da ecotina selvagem possui 5 ligações de hidrogênio e 7 interações hidrofóbicas a menos do que aquele que possui o monômero da ecotina M84R, M85R, onde verifica-se o aparecimento de novas interações como as ligações de hidrogênio entre a Arg84 da ecotina RR e a Asp³⁷⁰, Ser³⁷¹ e Gly³⁹⁹ do u-PA. Em relação as regiões do sítio secundário dos complexos verifica-se o aparecimento de uma nova ligação de hidrogênio (entre Arg⁷⁰ da ecotina TSRR/R e a His²⁶⁰ da HP1).

O aumento do caráter eletropositivo observado nos mutantes da ecotina (RR e TSRR/R) gerou um aumento do número de interações entre estas proteínas e a HP1, bem como o u-PA. Assim, podemos observar que estas mutações são capazes de promover novas interações intermoleculares devido a alterações de resíduos de aminoácidos específicos nos sítios primário e secundário. Como mostrado, este conjunto de mutações na ecotina proporciona o surgimento de novas ligações, como as de hidrogênio, hidrofóbicas e Vander walls aumentando assim a afinidade da ecotina com as moléculas envolvidas na formação do complexo (ecotina - HP1 e ecotina – u-PA).

5.2 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA ECOTINA E SEUS MUTANTES CONTRA CEPAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS MULTIRESISTENTES.

Cepas bacterianas de *Escherichia coli* enteroagregativas (EAEC) secretam uma serino-protease autotransportadora de 104 kDa chamada de Pet, o qual possui um alto grau citotóxico às células epiteliais. Em 1999, Navarro-García e colaboradores demonstraram a redução deste efeito citotóxico em células Hep-2 ao inibir a Pet utilizando-se de um inibidor clássico de serino-proteases o fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF) apontando esse tipo de inibidor como potencial protótipo para o desenvolvimento de novos antibióticos. Estes dados nos orientaram para a

realização de um estudo envolvendo a ecotina, uma vez que, esta proteína é um potente inibidor de serino-proteases assim como o PMFS. Tendo em vista o perfil inibitório da ecotina, analisamos o seu possível potencial antibacteriano, considerando que algumas cepas bacterianas produzem serino-proteases denominadas SPATEs que são fundamentais para o desenvolvimento da bactéria e uma vez inibidas acarretam perda de funções.

De forma geral, a inibição do crescimento bacteriano não foi evidenciada em nossos experimentos seja utilizando cepas Gram positivas ou Gram negativas, quando adicionamos a ecotina selvagem (WT) ou suas formas mutantes RR (Met84Arg e Met85Arg) e TSRRR (Asp70Arg, Val81Thr, Thr83Ser, Met84Arg e Met85Arg), em discos de filtro, o que indica algumas hipóteses. A primeira se deve a possibilidade da ecotina não ter interagido de maneira eficiente com as serino-proteases devido uma baixa difusão da ecotina no meio. A segunda diz respeito a possibilidade das bactérias utilizarem outros mecanismo de sobrevivência que independem da participação das serino-proteases liberadas no meio extracelular. A terceira e última hipótese se relaciona a um possível mecanismo de proteção desenvolvido por algumas bactérias como a *E. coli* que produzem a ecotina.

Tendo em vista a gravidade de infecções bacterianas envolvendo o sistema nervoso central e a presença cada vez maior de cepas multiresistentes, nossos dados mesmo que negativos, não alteram significativamente o fato de que o estudo sobre o perfil antibacteriano da ecotina ainda merece ser mais explorado. Assim, o fato da ecotina não inibir o crescimento bacteriano pode sugerir que a otimização do protocolo laboratorial através da avaliação de outras cepas e a utilização de meios de cultura mais apropriados poderiam avaliar o real impacto da ecotina e de seus mutantes sobre o crescimento bacteriano, com importância para o tratamento futuro de infecções bacterianas que afetam o sistema nervoso central.

6. CONCLUSÕES

6.1 ANÁLISE TEÓRICA DA INTERAÇÃO DA ECOTINA E SEUS MUTANTES COM A HAPTOGLOBINA-1 UTILIZANDO TÉCNICAS DE MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA.

- A cadeia leve (α) da HP1 é similar as proteases do sistema complemento e apolipoproteína-H, enquanto a cadeia pesada (β) é similar a diversas serino-proteases, apesar de diferenças importantes como a ausência dos três aminoácidos catalíticos (Ser¹⁹⁵, Asp¹⁰², His⁵⁷).
- Os modelos dos monômeros da HP1, sua forma dimérica, e ecotinas mutantes se mostraram estáveis e confiáveis pela análise do gráfico de Ramachandran, com baixos RMS na análise comparativa junto as proteínas similares indicando a conservação estrutural
- A estrutura monomérica da ecotina selvagem e de seus mutantes se liga ao modelo da haptoglobina-1 pelo sítio secundário, com formação de várias interações, reforçando as indicações dos dados experimentais que apontam a formação de um complexo ternário.
- Fatores estruturais importantes condicionam a formação do complexo ternário (ecotina – haptoglobina- u-PA) como a estrutura do inibidor (monômero ou dímero), e mutações pontuais (RR e TSRRR)
- A interação da haptoglobina com as ecotinas mutantes (principalmente a ecotina TSRRR) gera um padrão de ligação diferenciado, com o envolvimento de novos resíduos como a Arg⁷⁰ da ecotina TSRR/R e a His²⁶⁰ da HP1, podendo representar um possível aumento da força de interação entre estas moléculas, o que justificaria o tempo de circulação da ecotina no sangue por 12-14h.

6.2 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA ECOTINA E SEUS MUTANTES CONTRA CEPAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS MULTIRESISTENTES.

- Apesar da ecotina e seus mutantes não inibirem o crescimento bacteriano, a hipótese de uma possível atividade antimicrobiana não pode ser descartada, tendo em vista que outras bactérias e condições de cultivo ainda podem ser exploradas para determinar o perfil antimicrobiano destas moléculas.

7. BIBLIOGRAFIA

ABREU, P.A. **(2008)** Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas. Dissertação submetida à universidade federal fluminense visando a obtenção do grau de mestre em neuroimunologia.

AFFARA, N.I.; ANDREU, P.; COUSSENS, L.M. **(2009)** Delineating protease functions during cancer development. *Methods Mol Biol.* 539:1-32.

AGUIRRE GHISO, J.A. **(1999)** Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur J Biochem.* 263:295-304.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. **(1990)** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3): 403-410.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J., ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. **(1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.

ANDREASEN, P.A.; KJØLLER, L.; CHRISTENSEN, L.; DUFFY, M.J. **(1997)** The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer.* 72(1):1-22.

ANJOS, L.P.; QUEIRÓS, F.; PEREIRA, M.C.; BRANDÃO, M.; MELO, A.; LUCENA R. **(2004)** Prognóstico audiológico tardio relacionado à meningite em lactentes. *Arq Neuropsiquiatr.* 62(3-A):635-640.

ARAGÃO, M.F.V.; OTADUY, M.C.G.; MELO, R.V.; FILHO, H.R.C.A.; VICTOR, E.G.; SILVA, J.L.; ARAÚJO N.; LEITE, C.C.; VALENÇA, M.M. **(2007)** Espectroscopia

multivoxel com tempo de eco curto: a razão colina/N-acetil-aspartato e a graduação dos astrocitomas cerebrais. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 65(2A):286-294.

ARCOLEO, J.P.; GREER, J.(1982) Hemoglobin binding site and its relationship to the serine protease-like active site of haptoglobin, *J Biol Chem.* 257:10063–10068.

BATCHELOR, T.T.; DORFMAN, M.V.; HUNTER, D.J. (2005) Cancer of the Nervous System: Epidemiology, Pathology, and Imaging of Brain Tumors. 2 Philadelphia: *Lippincott Williams&Wilkins.* p 1.

BEHIN, A. HOANG-XUAN, K.; CARPENTIER, A.F.; DELATTRE, J.Y. (2003) Primary brain tumours in adults. *Lancet.* 361(9354):323-331.

BELIZÁRIO, E.J. (2002) O próximo desafio reverter o câncer. *Ciência Hoje.* 31(184):52.

BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T.F.; WILLIAMS, G.J.; MEYER, E.F.JR.; BRICE, M.D.; RODGERS, J.R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCI, T.; TASUMI, M. (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol.* 112(3):535-542.

BOISEN, N.; RUIZ-PEREZ, F.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. (2009) Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.* 80(2):294-301.

BORGOÑO, C.A.; MICHAEL, I.P.; SHAW, J.L.; LUO, L.Y.; GHOSH, M.C.; SOOSAIPILLAI, A.; GRASS, L.; KATSAROS, D.; DIAMANDIS, E.P. (2007) Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *J Biol Chem.* 282(4):2405-2422.

BÖTTCHER, T. (2009) Pathophysiology of neuronal injury in bacterial meningitis and experimental adjunctive therapeutic approaches. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 77 Suppl 1:S7-9.

BRANCO, R.G., AMORETTI, C.F.; TASKER, R.C. **(2007)** Doença meningocócica e meningite. *J Pediatr.* 83(2):46-53.

BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. **(2005)** The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer.* 5(3):231-237.

BYRD, T.F.; DAVIS, L.E. **(2007)** Multidrug-resistant tuberculous meningitis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 7(6):470-475.

CAIRNCROSS, G.; BERKEY, B.; SHAW, E.; JENKINS, R.; SCHEITHAUER, B.; BRACHMAN, D.; BUCKNER, J.; FINK, K.; SOUHAMI, L.; LAPERIERRE, N.; MEHTA, M.; CURRAN, W. **(2006)** Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol.* 24(18):2707-2714.

CASTRO, H.C.; SILVA, D.M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R.B. **(2001)** Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta.* 1547(2): 183–195.

CASTRO, H.C.; MONTEIRO, R.Q.; ASSAFIM, M.; LOUREIRO, N.I.; CRAIK, C.; ZINGALI, R.B. **(2006)** Ecotin modulates thrombin activity through exosite-2 interactions. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(11):1893-1900.

CAVENEY, W.K. FURNARI, F.B.; NAGANE, M.; HUANG, H.J.S.; NEWCOMB, E.W.; BIGNER, D.D.; WELTER, M.; BERENS, M.E.; PLATE, K.H.; ISRAEL, M.A.; NOBLE, M.D.; KLEIHUES, P. **(2000)** Diffusely infiltrating astrocytomas. In Kleihues P, Cavenee WK (Eds). Pathology and genetics of tumours of the nervous system. World Health Organization Classification Tumors (WHO). Lyon: IARC Press:10-21.

CHUNG, C.H. IVES, H.E.; ALMEDA, S.; GOLDBERG, A.L. **(1983)** Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. *J Biol Chem.* 258:11032-11038

COURTNEY M.; JALLAT, S.; TESSIER, L.H.; BENAVENTE, A.; CRYSTAL, R.G.; LECOCQ, J.P. **(1985)** Synthesis in *E. coli* of alpha 1-antitrypsin variants of therapeutic potential for emphysema and thrombosis. *Nature*. 313(5998):149-151.

D'ARMIENTO, J.; DALAL, S.S.; CHADA, K. **(1997)** Tissue, temporal and inducible expression pattern of haptoglobin in mice. *Gene*. 195(1):19-27.

DEANGELIS, L. M. **(2005)** Chemotherapy for brain tumors--a new beginning. *N Engl J Med*. 352(10):1036-1038.

DÉSILETS, A.; LONGPRÉ J.M.; BEAULIEU, M.E.; LEDUC, R. **(2006)** Inhibition of human matriptase by eglin c variants. *FEBS Lett*. 580(9):2227-2232.

DI CERA, E. **(2009)** Serine proteases. *IUBMB Life*. 61(5):510-515.

DOBRYSZYCKA, W. **(1997)** Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. *Eur J Chem Clin Biochem*. 35(9):647-654.

DRAGO-SERRANO, M.E.; PARRA, S.G.; MANJARREZ-HERNÁNDEZ, H.A. **(2006)** EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiol Lett*. 265(1):35-40.

DUFFY, M.J.; MCGOWAN, P.M.; GALLAGHER, W.M. **(2008)** Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol*. 214(3):283-293.

DURAND, M.L.; CALDERWOOD S.B.; WEBER, D.J.; MILLER, S.I.; SOUTHWICK, F.S.; CAVINESS, V.S.JR.; SWARTZ, M.N. **(1993)** Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med*. 328(1):21-28.

EGGERS, C.T.; MURRAY, I.A.; DELMAR, V.A.; DAY, A.G.; CRAIK, C.S. **(2004)** The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase. *Biochem J*. 379:107-118.

ERPEL, T.; HWANG, P.; CRAIK, C.S.; FLETTERICK, R.J.; MCGRATH, M.E. **(1992)** Physical map location of the new *Escherichia coli* gene *eco*, encoding the serine protease inhibitor *ecotin*. *J Bacteriol*, 174(5):1704-1710.

ETTRICH, R. BRANDT, W. JR.; KOPECKÝ, V.; BAUMRUK, V.; HOFBAUEROVÁ, K.; PAVLÍČEK, Z. **(2002)** Study of chaperone-like activity of human haptoglobin: conformational changes under heat shock conditions and localization of interaction sites. *J Biol Chem*. 383(10):667-676.

FABBRI, N.; FARFALLI, G.; GAMBERI, G.; BENASSI, S.; BRICCOLI, A.; MERCURI, M. **(2009)** Metastatic giant cell tumor of bone: relationship with urokinase-type plasminogen activation system and clinical outcome. *J Bone Joint Surg Am*. 91-B(SUPP_1):136.

FAYARD, B.; BIANCHI, F.; DEY, J.; MORENO, E.; DJAFFER, S.; HYNES, N.E.; MONARD, D. **(2009)** The Serine Protease Inhibitor Protease Nexin-1 Controls Mammary Cancer Metastasis through LRP-1–Mediated MMP-9 Expression. *Cancer Res*. 69(14):5690-5698.

FLICKINGER, J.C. **(2009)** Cancer Neurology in Clinical Practice: Neurological Complications of Cancer and Its Treatment, 2nd Edition. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*.73(2):635.

GABORIAUD, C.; ROSSI, V.; BALLY, I.; ARLAUD, G.J.; FONTECILLA-CAMPS, J.C. **(2000)** Crystal structure of the catalytic domain of human complement *c1s*: a serine protease with a handle. *EMBO J*. 19(8):1755-1765.

GREER, J. **(1980)** A model for haptoglobin heavy chain based upon structural homology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(6):3393-3397.

GREER, J. **(1981)** Comparative model-building of the mammalian serine proteases. *J Mol Biol*. 163:1027-1042.

GEORGE, R.A.; SPRIGGS, R.V.; BARTLETT, G.J.; GUTTERIDGE, A.; MACARTHUR, M.W.; PORTER, C.T.; AL-LAZIKANI, B., THORNTON, J.M.; SWINDELLS, M.B. **(2005)** Effective function annotation through catalytic residue conservation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(35):12299-12304.

GERSTNER, E.R.; DUDA, D.G.; DI TOMASO, E.; RYG, P.A.; LOEFFLER, J.S.; SORENSEN, A.G.; IVY, P.; JAIN, R.K.; BATCHELOR, T.T. **(2009)** VEGF inhibitors in the treatment of cerebral edema in patients with brain cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 6(4):229-236.

GILLMOR, S.A.; TAKEUCHI, T.; YANG, S.Q.; CRAIK, C.S.; FLETTERICK, R.J. **(2000)** Compromise and Accommodation in Ecotin, a Dimeric Macromolecular Inhibitor of Serine Proteases. *J Mol Biol.* 299(4):993-1003.

GOEL, A.; CHAUHAN, S.S. **(1997)** Role of proteases in tumor invasion and metastasis. *Indian J Exp Biol.* 35:553-564.

GOMES, R. **(1997)** Oncologia básica. Rio de Janeiro: *Revinter.* p.404.

GREENMAN, C.; STEPHENS, P.; SMITH, R.; DALGLIESH, G.L.; HUNTER, C.; BIGNELL, G.; DAVIES, H.; TEAGUE, J.; BUTLER, A.; STEVENS, C.; EDKINS, S.; O'MEARA, S.; VASTRIK, I.; SCHMIDT, E.E.; AVIS, T.; BARTHORPE, S.; BHAMRA, G.; BUCK, G.; CHOUDHURY, B.; CLEMENTS, J.; COLE, J.; DICKS, E.; FORBES, S.; GRAY, K.; HALLIDAY, K.; HARRISON, R.; HILLS, K.; HINTON, J.; JENKINSON, A.; JONES, D.; MENZIES, A.; MIRONENKO, T.; PERRY, J.; RAINE, K.; RICHARDSON, D.; SHEPHERD, R.; SMALL, A.; TOFTS, C.; VARIAN, J.; WEBB, T.; WEST, S.; WIDAA, S.; YATES, A.; CAHILL, D.P.; LOUIS, D.N.; GOLDSTRAW, P.; NICHOLSON, A.G.; BRASSEUR, F.; LOOIJENGA, L.; WEBER, B.L.; CHIEW, Y.E.; DEFAZIO, A.; GREAVES, M.F.; GREEN, A.R.; CAMPBELL, P.; BIRNEY, E.; EASTON, D.F.; CHENEVIX-TRENCH, G.; TAN, M.H.; KHOO, S.K.; TEH, B.T.; YUEN, S.T.; LEUNG, S.Y.; WOOSTER, R.; FUTREAL, P.A.; STRATTON, M.R. **(2007)** Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature.* 446(7132):153-158.

GUEX, N.; PEITSCH, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18(15):2714–2723.

HAKAN, T. (2008) Management of bacterial brain abscesses. *Neurosurg Focus*. 24(6):E4.

HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R.C.; ALA'ALDEEN, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68(4):692-744.

HU, B.; JARZYNSKA, M.J.; GUO, P.; IMANISHI, Y.; SCHLAEPFER, D.D.; CHENG, S.Y. (2006) Angiopoietin 2 Induces Glioma Cell Invasion by Stimulating Matrix Metalloprotease 2 Expression through the $\alpha_5\beta_1$ Integrin and Focal Adhesion Kinase Signaling Pathway. *Cancer Res*. 66(2):775-783.

HUDIG, D.; POWERS, J. C. (1993) Use of protease inhibitors as probes for biological functions: conditions, controls and caveats. In *Citotoxic Cells*, Sitkovsky, M.; Henkart, P., ed: *Birkhauser*. Boston. 502-507 p.

ISHIDA, T. (2006) Low-barrier hydrogen bond hypothesis in the catalytic triad residue of serine proteases: correlation between structural rearrangement and chemical shifts in the acylation process. *Biochemistry*. 45(17):5413-5420.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1997) *Biologia Celular e Molecular*, Rio de Janeiro. 6^a ed: *Guanabara Koogan*. 489 p.

KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KÜNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res*. 37:D387-92.

KIRCHEIMER, J.C.; PFLÜGER, H.; RITSCHL, P.; HIENERT, G.; BINDER, B.R. (1985) Plasminogen activator activity in bone metastasis as compared to primary tumors. *Invasion Metastasis*. 5(6):344-355.

KLEIHUES, P.; LOUIS, D.N.; SCHEITHAUER, B.W.; RORKE, L.B.; REIFENBERGER, G.; BURGER, P.C.; CAVENEE, W.K. **(2002)** The WHO classification of tumours of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(3):215-225.

KUROSUKY, A.; BARNETT, D.R.; LEE, T.H.; TOUCHSTONE, B.; HAY, R.E.; ARNOTT, M.S.; BOWMAN, B.H.; FITCH, W.M. **(1980)** Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(6):3388–3392.

LABOISSIÈRE, M.C.; YOUNG, M.M.; PINHO, R.G.; TODD, S.; FLETTERICK, R.J.; KUNTZ, I.; CRAIK, C.S. **(2002)** Computer-assisted Mutagenesis of Ecotin to Engineer Its Secondary Binding Site for Urokinase Inhibition. *J Biol Chem.* 277:26623–26631.

LANGLOIS, M.R.; DELANGHE, J.R. **(1996)** Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem.* 42:1589-1600.

LASKOWSKI, M.J.; KATO, I. **(1980)** Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* 49:593-626.

LAUFS, S.; SCHUMACHER, J.; ALLGAYER, H. **(2006)** Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle.* 5(16):1760-1771.

LEE M.Y.; KIM, S.Y.; CHOI, J.S.; LEE, I.H.; CHOI, Y.S.; JIN, J.Y.; PARK, S.J.; SUNG, K.W.; CHUN, M.H.; KIM, I.S. **(2002)** Upregulation of haptoglobin in reactive astrocytes after transient forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22(10):1176-1180.

LIU, B.; SCHOFIELD C.J.; WILMOUTH, R.C. **(2006)** Structural Analyses on Intermediates in Serine Protease Catalysis. *J Biol Chem.* 281(33):24024-24035.

MADSEN, M.; MØLLER, H.J.; NIELSEN, M.J.; JACOBSEN, C.; GRAVERSEN, J.H.; VAN DEN BERG, T.; MOESTRUP, S.K. **(2004)** Molecular characterization of the haptoglobin.hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region, *J Biol Chem.* 279:51561–51567.

MARKANTONIS, S.L.; MARKOU, N.; FOUSTERI, M.; SAKELLARIDIS, N.; KARATZAS, S.; ALAMANOS, I.; DIMOPOULOU, E.; BALTOPOULOS, G. **(2009)** Penetration of colistin into the cerebrospinal fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(11):4907-4910.

MCCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. **(2000)** Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today.* 6(4):149-156.

MCCRUDDEN, M. T.; RYAN, L.A.; TURKINGTON, P.; TIMSON, D.J. **(2009)** The contribution of key hydrophobic residues in ecotin to enzyme-inhibitor complex stability. *J Enzyme Inhib Med Chem.*

MCGRATH, M.E.; ERPEL, T.; BROWNER, M.F.; FLETTERICK, R.J. **(1991a)** Expression of the protease inhibitor ecotin and its co-crystallization with trypsin. *J Mol Biol.* 222(2):139-142.

MCGRATH, M.E.; HINES, W.M.; SAKANARI, J.A.; FLETTERICK, R.J.; CRAIK, C.S. **(1991b)** The sequence and reactive site of ecotin. A general inhibitor of pancreatic serine proteases from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 266(10):6620-6625.

MCGRATH, M.E.; ERPEL, T.; BYSTROFF, C.; FLETTERICK, R.J. **(1994)** Macromolecular chelation as an improved mechanism of protease inhibition: structure of the ecotin-trypsin complex. *Embo J.* 13(7):1502-1507.

MCGRATH, M.E.; GILLMOR, S.A.; FLETTERICK, R. J. **(1995)** Ecotin: lessons on survival in a protease-filled world. *Prot Sci.* 4:141-148.

MÉTHOT, N.; RUBIN, J.; GUAY, D.; BEAULIEU, C.; ETHIER, D.; REDDY, T.J.; RIENDEAU, D.; PERCIVAL, M.D. **(2007)**. Inhibition of the activation of multiple serine proteases with a cathepsin C inhibitor requires sustained exposure to prevent pro-enzyme processing. *J Biol Chem.* 282(29):20836-20846.

MEDDISCOVERY. **(2009)** The onco-urology company. Disponível em: <http://www.med-discovery.com/img/sciences_1.jpg>. Acesso em 11 de Setembro de 2009.

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, K.A.; FAUSTO, N. **(2006)** Robbins & Cotran, Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro. 7ª ed. *Elsevier*. p.153-185.

NASCIMENTO, C.O.; HUNTER, L.; TRAYHURN, P. **(2004)** Regulation of haptoglobin gene expression in 3T3-L1 adipocytes by cytokines, catecholamines, and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 313(3):702-708.

NAU, R.; ÖRGEL, F.; PRANGE, H. W. **(1998)** Pharmacokinetic optimisation of the treatment of bacterial central nervous system infections. *Clin Pharmacokinet.* 35(3):223-246.

NAVARRO-GARCIA, F.; SEARS, C.; ESLAVA, C.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J.P. **(1999)** Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.*67(5): 2184-2192.

NELSON, D.L; COX, M.M. **(2002)** Lehninger princípios de bioquímica. São Paulo. 3ª ed. *Sarvier*. p.92.

NIELSEN, M. J.; PETERSEN, S.V.; JACOBSEN, C.; THIRUP, S.; ENGHILD, J.J.; GRAVERSEN, J.H.; MOESTRUP, S.K. **(2007)** unique loop extension in the serine protease domain of haptoglobin is essential for CD163 recognition of the haptoglobin-hemoglobin complex. *J Biol Chem.* 282(2):1072-1079.

OLIVEIRA C. (2006) Os efeitos das drogas no cérebro. *Rev Ciênc Tecnol Inov* [online] 78: 12. Disponível em: <<http://www.cienciapt.net>>. Acesso em 19/10/2009.

OLSON, G. E.; WINFREY, V.P.; MATRISIAN, P.E.; MELNER, M.H.; HOFFMAN, L.H. (1997) Specific expression of haptoglobin mRNA in implantation-stage rabbit uterine epithelium. *J Endocrinol.* 152(1):69-80.

OTTO, B.R.; SIJBRANDI, R.; LUIRINK, J.; OUDEGA, B.; HEDDLE, J.G.; MIZUTANI, K.; PARK, S.Y.; TAME, J.R. (2005) Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 280(17):17339-17345.

PAL, G.; SPRENGEL, G.; PATTHY, A.; GRAF, L. (1994) Alteration of the specificity of ecotin, an *E. coli* serine proteinase inhibitor, by site directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 342:57-60.

PAL, G.; SZILAGYI, L.; GRAF, L. (1996) Stable monomeric form of an originally dimeric serine proteinase inhibitor, ecotin, was constructed via site directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 385:165-170.

PAMPALAKIS, G.; SOTIROPOULOU, G. (2007) Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 1776(1):22-31.

PASTERNAK J.J. (2002) Genética Molecular Humana. Mecanismos de Doenças Hereditárias. *Manole* 1^a ed. p.365-412.

PERONA, J.J.; HEDSTROM, L.; RUTTER, W.J.; FLETTERICK, R.J. (1995) Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry.* 34(5):1489-1499.

PERONA, J.J.; CRAIK, C.S. (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J Biol Chem.* 272: 29987-29990.

POLONOVSKI, M.; JAYLE, M. F. **(1938)** Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydasique, l'haptoglobine. *C R Soc Biol.* 129:457-460.

POLTICELLI, F.; BOCEDI, A.; MINERVINI, G.; ASCENZI, P. **(2008)** Human haptoglobin structure and function--a molecular modelling study. *FEBS J.* 275(22):5648-5656.

POURNARAS, S.; IOSIFIDIS, E.; ROILIDES, E. **(2009)** Advances in antibacterial therapy against emerging bacterial pathogens. *Semin Hematol.* 46(3):198-211.

PRUITT, A. A. **(1998)** Infections of the nervous system. *Neurol Clin.* 16(2):419-447.

QUAGLIARELLO, V.; SCHELD, W.M. **(1992)** Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med.* 327(12):864-872.

RABBANI, S.A. **(1998)** Metalloproteases and urokinase in angiogenesis and tumor progression. *In Vivo.* 12:135-142.

REINHECKEL, T.; GOCHEVA, V.; PETERS, C.; JOYCE, J.A. **(2008)** Roles of Cysteine Proteases in Tumor Progression: Analysis of Cysteine Cathepsin Knockout Mice in Cancer Models. *The Cancer Degradome Proteases and Cancer Biology.* Springer New York. p. 281-304.

SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. **(2001)** The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. *Revista brasileira de cancerologia.* 47(3), 303-308.

SÁ, P.N.D.; LIN, K. **(2002)** Aspectos Farmacodinâmicos dos Agentes Antibacterianos. *Arquivos Catarinenses de Medicina, Florianópolis.* 31:25-30.

SADRZADEH, S.M.; BOZORGMEHR, J. **(2004)** Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol.* 121:97-104.

SANTOS C. **(2006)** Neurociências e conhecimento do cérebro. *Rev Cienc Tecnol Inov* [on-line] 2006; 78:2. Disponível em: <<http://www.cienciapt.net>>. Acesso em 19/10/2009.

SATHLER, P.C.; CRAIK, C.; TAKEUCHI, T.; ZINGALI, R.B.; CASTRO, H.C. **(2009)** Engineering Ecotin for Identifying Proteins with a Trypsin Fold. *Appl Biochem Biotechnol*. [Epub ahead of print]

SATO, T.; TAKAHASHI, S.; MIZUMOTO, T.; HARAO, M.; AKIZUKI, M.; TAKASUGI, M.; FUKUTOMI, T.; YAMASHITA, J. **(2006)** Neutrophil elastase and cancer. *Surgical Oncology*. 15(4): 217-222, 2006.

SEONG, I. S.; LEE, H. R.; SEOL, J.H.; PARK, S.K.; LEE, C.S.; SUH, S.W.; HONG, Y.M.; KANG, M.S.; HA, D.B.; CHUNG, C.H. **(1994)** The P1 reactive site methionine residue of ecotin is not crucial for its specificity on target proteases. A potent inhibitor of pancreatic serine proteases from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 269:21915-21918.

SELVARAJAN, S.; LUND, L.R.; TAKEUCHI, T.; CRAIK, C.S.; WERB, Z. **(2001)** A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. *Nat Cell Biol*. 3(3):267 – 275.

SERGEI, D.V.; GARIEV, I.A.; UPOROV I.V. **(2005)** Catalytic sites of hydrolases: structures and catalytic cycles. *Russ Chem*. 74: 61-76.

SEYMOUR, J.L.; LINDQUIST, R.N.; DENNIS, M.S.; MOFFAT, B.; YANSURA, D.; REILLY, D.; WESSINGER, M.E.; LAZARUS, R.A. **(1994)** Ecotin is a potent anticoagulant and reversible tight-binding inhibitor of factor Xa. *Biochemistry*, 33(13):3949-3958.

SHIN, D.H.; SONG, H.K.; SEONG, I.S.; LEE, C.S.; CHUNG, C.H.; SUH, S.W. **(1996)** Crystal structure analyses of uncomplexed ecotin in two crystal forms: implications for its function and stability. *Protein Sci*. 5(11):2236-2247.

STOOP, A.A.; CRAIK, C.S. **(2003)** Engineering of a macromolecular scaffold to develop specific protease inhibitors. *Nat Biotechnol.* 21:1063-1068.

STROTHER, D.R.; POLLACK, I.F.; FISHER, P.G.; HUNTER, J.V.; WOO, S.Y.; POMEROY, S.L.; RORKE, L.B. **(2000)** Tumors of the central nervous system. In: Principles and practice of Pediatric Oncology. Pizzo PA, Poplack DG (eds). 4th edition. *Lippincott Williams and Wilkins*. Philadelphia. p. 751-824.

TAKEUCHI, T.; SHUMAN, M.A.; CRAIK, C.S. **(1999)** Reverse biochemistry: Use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11054-11061.

THEILGAARD-MÖNCH, L.C.; JACOBSEN, L.C.; NIELSEN, M.J.; RASMUSSEN, T.; UDBY, L.; GHARIB, M.; ARKWRIGHT, P.D.; GOMBART, A.F.; CALAFAT, J.; MOESTRUP, S.K.; PORSE, B.T.; BORREGAARD, N. **(2006)** Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation, *Blood.* 108(1): 353-361.

TOLSON, J. BOGUMIL, R.; BRUNST, E.; BECK, H.; ELSNER, R.; HUMENY, A.; KRATZIN, H.; DEEG, M.; KUCZYK, M.; MUELLER, G.A.; MUELLER, C.A.; FLAD, T. **(2004)** Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal cancer patients. *Lab Invest.* 84(7):845-856.

TONINATO, M.D.A. **(2007)** Ethical and bioethical challenges of neuroscience. *Bioethikos.* Centro Universitário São Camilo. 1(2):p.88-95.

TOSI, M.; DUPONCHEL, C.; MEO, T.; COUTURE-TOSI, E. **(1989)** Complement genes C1r and C1s feature an intronless serine protease domain closely related to haptoglobin, *J Mol Biol.* 208(4):709–714.

TURK, B. **(2006)** Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 5:785-779.

TYLER, K.L. **(2009)** Neurological infections: advances in therapy, outcome, and prediction. *Lancet Neurol.* 8(1):19-21.

UHLAND, K. **(2006)** Matriptase and its putative role in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 63(24): 2968-2978.

URONEWS. **(2003)** Câncer de próstata, hiperplasia benigna e tratamento do câncer de próstata progressivo. *Sociedade Brasileira de Urologia*, 2003. Disponível em: < <http://www.uronews.org.br> >. Acesso em 09/10/2009

VALERA E.T. **(2006)** Análise do perfil de expressão de genes relacionados à resistência múltipla a drogas em tumores do sistema nervoso central por PCR quantitativa. Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Puericultura e Pediatria.

VAN DE BEEK, D.; DE GANS, J.; TUNKEL, A.R.; WIJDICKS, E.F.M. **(2006)** Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med.* 354(1):44-53.

VAN VLIERBERGHE, H., LANGLOIS, M.R; DELANGHE, J.R. **(2004)** Haptoglobin polymorphism and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta*, 345: 35-42.

VITORINO-CARDOSO, A. F.; PEREIRA RAMOS, O.H.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. **(2006)** Insights into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modeling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem Mol Biol.* 144(3):334-342.

VOGT, C. **(2002)** À Luz da Ciência. *Revista eletrônica de jornalismo científico.* Disponível em: < <http://www.comciencia.br/reportagens/epilepsia/ep01.htm> >. Acesso em 09/10/2009.

WANG, C.I.; YANG, Q.; CRAIK, C.S. **(1995)** Isolation of a high affinity inhibitor of urokinase-type plasminogen activator by phage display of ecotin. *J Biol Chem.* 270(20):12250-12256.

WANG, H.; GAO, X.H.; WANG, Y.K.; LI, P.; HE, C.D.; XIE, Y.; CHEN, H.D. **(2005)** Expression of haptoglobin in human keratinocytes and Langerhans cells. *Br J Dermatol.* 153(5):894-899.

WASSEL, J. **(2000)** Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab.* 46(11-12):547-552.

WEJMAN, J.C.; HOVSEPIAN, D.; WALL, J.S.; HAINFELD, J.F.; GREER, J. **(1984)** Structure of haptoglobin and the haptoglobin-hemoglobin complex by electron microscopy. *J Mol Biol.* 174:319 – 341.

WINTROBE, M. M. **(1998)** *Hematologia Clínica.* São Paulo: Editora Manole Ltda. p. 208-238.

WICHER, K.B.; FRIES E. **(2007)** Convergent Evolution of Human and Bovine Haptoglobin: Partial Duplication of the Genes. *J Mol Evol.* 65(4):373-379.

YANG, F.; BRUNE, J.L.; BALDWIN, W.D.; BARNETT, D.R.; BOWMAN, B.H. **(1983)** Identification and characterization of human haptoglobin cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:5875-5879.

YANG, S.Q.; WANG, C.I.; GILLMOR, S.A.; FLETTERICK, R.J.; CRAIK, C.S. **(1998)** Ecotin: a serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites. *J Mol Biol.* 279(4):945-957.

YANG, S.Q.; CRAIK, C.S. **(1998)** Engineering bidentate macromolecular inhibitors for trypsin and urokinase-type plasminogen activator. *J Mol Biol.* 279:1001-1011.

YANG, F.; GHIO, A.J.; HERBERT, D.C.; WEAKER, F.J.; WALTER, C.A.; COALSON, J.J. **(2000)** Pulmonary expression of the human haptoglobin gene. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23(3):277-282.

YANO, A.; YAMAMOTO, Y.; MIYAISHI, S.; ISHIZU, H. **(1998)** Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. *Acta Med Okayama.* 52(4):173- 181.

YEN, Y.T.; KOSTAKIOTI, M.; HENDERSON, I.R.; STATHOPOULOS, C. **(2008)** Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol.*16(8):370-379.

YOSHIDA, E.; VERRUSIO, E.N.; MIHARA, H.; OH, D.; KWAAN, H.C. **(1994)** Enhancement of the expression of urokinase-type plasminogen activator from PC-3 human prostate cancer cells by thrombin. *Cancer Res.* 54(12):3300-3304.

ZACCARIOTTO, T.R.; ROSIM, E.T.; MELO, D.; GARCIA, P.M.; MUNHOZ, R.R.; AOKI, F.H.; DE FATIMA SONATI, M. **(2006)** Haptoglobin polymorphism in a HIV-1 seropositive Brazilian population. *J Clin Pathol.* 59(5):550-553.

ZHUA, L.; SONG, L.; CHANG, Y.; XU, W.; WU, L. **(2006)** Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Fish Shellfish Immunol.* 20(3):320-331.

ZHOU, A.; CARRELL, R. W. **(2008)** Dimers initiate and propagate serine protease inhibitor polymerisation. *J Mol Biol.* 375(1):36-42.

8. APÊNDICES

8.1 LISTA DE ARTIGOS PUBLICADOS.

1. PINHEIRO, L.C.; ABREU, P.A.; AFONSO, I.F.; LEAL, B.; CORRÊA, L.C.; BORGES, J.C.; MARQUES, I.P.; LOURENÇO, A.L.; **SATHLER, P.C.**; DOS SANTOS, A.L.; MEDEIROS, C.A.; CABRAL, L.M.; JÚNIOR, M.L.; ROMEIRO, G.A.; FERREIRA, V.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C.; BERNARDINO, A.M. **(2008)** Identification of a Potential Lead Structure for Designing New Antimicrobials to Treat Infections Caused by Staphylococcus epidermidis-Resistant Strains. *Current Microbiology*. 57:463 – 468.
2. WANIEK, P.J.; CASTRO, H.C.; **SATHLER, P.C.**; MICELI, L.A.; JANSEN, A.M.; ARAÚJO, C.A.C.**(2009)** Two novel defensin encoding genes of the Chagas disease vector Triatoma brasiliensis (Reduviidae, Triatominae): characterization of expression and three dimensional structures. *Journal of Insect Physiology*. 55:840–848.
3. **SATHLER, P.C.**; CRAIK, C.; TAKEUCHI, T.; ZINGALI, R.B.; CASTRO, H.C. **(2009)** Engineering Ecotin for Identifying Proteins with a Trypsin fold. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
4. FREITAS, R.C.; CASTRO, H.C.; ABREU, P.A.; **SATHLER, P.C.**; VENTURA, A.L.M. **(2009)** Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo, *Revista de Psiquiatria Clínica*.

8.2 APENDICE 1 – SATHLER *et al.*, 2009

Engineering Ecotin for Identifying Proteins with a Trypsin fold

Plínio C. Sathler¹, Charles Craik², Toshihiko Takeuchi²,
Russolina B. Zingali³ and Helena C. Castro^{1,2,3*}

¹LaBioMol, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, RJ, 24001-970, Brazil.

²Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, 600 16th Street, San Francisco, CA 94158, USA..

³LabHemoVen, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Estrutural, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 21941-590. Brazil.

Correspondence address:

Helena Carla Castro. Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, LABioMol, 24210-130, Niterói, RJ, Brazil. Phone +55+21-26292294. E-mail: hcastrorangel@vm.uff.br and hcastrorangel@yahoo.com.br

Abstract: Ecotin is a bidentate, fold-specific inhibitor of mammalian serine-proteases produced by *Escherichia coli*. This molecule may be engineered to increase and/or change its affinity and specificity providing significant biotechnological potential. Since ecotin binds tightly to serine proteases of the trypsin fold, it may help to identify the role of these enzymes in different biological processes. In this work, we tested ecotin variants as an affinity purification reagent for identifying enzymes in samples of tumor progression and mammary gland involution. Initially, we used a commercial source of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) that remained fully active after elution from an affinity column of the ecotin variant (M84R, M85R). We then successfully identified u-PA from more complex mixtures including lysates from a prostate cancer cell line and involuting mouse mammary glands. Interestingly, a membrane-type serine protease 1 was isolated from the Triton X-100- solubilized PC-3 cell lysates, and surprisingly, haptoglobin, a serine-protease homolog protein, was also identified in mammary gland lysates and in blood. Haptoglobin does not prevent ecotin inhibition of u-PA, but it may act as a carrier within blood when ecotin is used in vivo. Finally, this affinity purification matrix was also able to identify a thrombin-like enzyme from snake venom using an ecotin variant directed against thrombin. Overall, the ecotin variants acted as robust tools for the isolation and characterization of proteins with a trypsin fold. Thus, they may assist in the understanding of the role of these serine proteases and homologous proteins in different biological processes.

Keywords: ecotin, inhibitor, affinity chromatography, dimeric inhibitor, urokinase-type plasminogen activator, haptoglobin

Introduction

Serine proteases possessing a trypsin fold are involved in many biological processes, including blood coagulation [1], metastasis of cancer cells [2], fibrinolysis [3], mammary gland involution [4], and the envenomation process [5]. These enzymes may be inhibited by ecotin, a periplasmic *Escherichia coli*-derived protein and a "fold-specific" inhibitor that has an unusually broad specificity to proteases such as trypsin, chymotrypsin, elastase, factor Xa, kallikrein, and factor XIIa [6, 7]. This inhibitor uses two distinct binding sites to recognize its target and has been engineered to potently and specifically inhibit proteases such as urokinase-type plasminogen activator (u-PA) [6–8]. Literature described that ecotin is able to purify recombinant trypsinogen expressed in *E. coli* [9] although it does not recognize more specific proteases such as u-PA.

Tissue culture cell lines serve as valuable models for cancer and cancer progression. Human PC-3 prostate carcinoma cells have been used as a model of prostate cancer [10]. This cell line expresses serine proteases such as u-PA [11] and the membrane-type serine protease 1 (MT-SP1) [12]. The isolation of proteases such as u-PA and MT-SP1 in different culture cell lines can aid in their characterization. Furthermore, new chromatographic techniques may serve as tools for discovering novel serine proteases derived from cell lines. Of greater complexity would be the isolation of proteases directly from tissue lysates, membranes, or rich mixtures such as involuting mammary glands [13] and snake venom [14], which require fast and reliable techniques.

Proteomics can identify new proteins and help determine their roles in normal physiologic or pathologic processes [15]. The use of ecotin variants that interact with a vast array of serine proteases may aid in isolating and characterizing proteases and homologous proteins from a variety of biological samples. In the present work, we describe the use of variant ecotins for identifying proteins from several biological sources, allowing simple and rapid identification of trypsin-fold proteins.

Materials and Methods

Materials

Snake venom from *Lachesis muta*, cyanogen bromide-activated agarose, and haptoglobin (Hp) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). PC-3 (CRL-1435) cells were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and grown according to the supplier's instructions. Human urokinase-type plasminogen activator, SPECTROZYME[®]UK substrate, and anti-u-PA polyclonal antibody were obtained from American Diagnostica (Greenwich, CT). All other reagents were purchased from Sigma or Fisher Scientific unless otherwise noted.

Preparation of Ecotin Affinity Column

Ecotin variants used in this study were ecotin-RR (M84R and M85R) constructed against u-PA and ecotin-TSRR/R (V81T, T83S, M84R, M85R, and D70R) against thrombin and u-PA. They were purified from *E. coli* as described [5].

Affinity columns were prepared by incubating the engineered ecotin (45 mg) with cyanogen bromide-activated agarose (15 mL) overnight in 100 mM Na bicarbonate (pH 8) at 4 °C. The ecotin column was washed extensively with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.5, and any unbound ecotin was washed out using 50 mM glycine, 100 mM NaCl, pH 3.0. The final column was equilibrated with PBS and stored at 4 °C.

Sample Preparation

Standard Serine Protease

Human urokinase-type plasminogen activator (3,000 IU) was diluted in 3 ml of PBS and applied directly to the ecotin-RR column.

Conditioned Media of Prostate Cancer Cells

The PC-3 (CRL-1435) cell line was grown at 37 °C in a serum-free medium in a 100-mm dish, and the supernatant was collected when cells had reached 90% confluency. This material (40 mL) was dialyzed against PBS, concentrated fourfold, and stored at 4 °C until being applied directly to the ecotin-RR column.

PC-3 Cell Lysates

The PC-3 cell line was grown to 90% confluency as listed above. The cells on the plate were washed twice with PBS. After washing, the cells were lysed with 1% Triton X-100, 5 mM EDTA in PBS. The cell lysate was collected and centrifuged, and the supernatant (10 mL) was collected and applied to an ecotin-RR column.

Mammary Gland Cells

Female CF1 mice were crossed with CD1 males (Charles River Biologicals, Wilmington, MA) and allowed to undergo a normal pregnancy. The pups were weaned following 7–10 days of lactation (day 0 of involution), and the dams were killed on day 5 of involution. Freshly isolated mammary tissue was snap frozen in liquid nitrogen and then homogenized in RIPA buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, 0.1% SDS), and the supernatant was collected as described [13]. The supernatant (10 mL) was dialyzed against PBS and stored at $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ until application on the ecotin-RR column.

Snake Venom

L. muta venom(50 mg)was partially purified using aMono-Q column (H10/10) on a Pharmacia FPLCR system. Proteins were eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl in 20 mMTris pH 7.5 at a flow rate of 2 ml/min. Fractions with the major proteolytic activity were pooled (10 mL), exhaustively dialyzed against PBS and applied to the ecotin-TSRR/R column.

Affinity Chromatography with Ecotin Column

The column (3 ml) with the ecotin variant bound to the agarose was initially equilibrated using 30 mL of PBS. Then, it was incubated with the protein samples for 1 h at room temperature in a closed flow system using a Pharmacia pump (0.5 mL/min) followed by washing with PBS (30 mL). Retained fractions were eluted with buffer containing 50 mM glycine and 100 mM NaCl pH 3.0 at 1 mL/min. Fractions were neutralized with 1 M Tris (10 $\mu\text{l/ml}$). Protein elution was monitored at 280 nm using a UVIKON 860 spectrophotometer. Protein-containing fractions were pooled and concentrated tenfold using a Centricon 10 concentrator (Amicon). The eluted material was resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresed (SDS-PAGE) and sequenced and/or analyzed by Western blotting.

PAGE and Western-Blot Analysis

Protein samples were electrophoresed on 10% SDS-PAGE according to Laemmli [16]. For immunoblot analysis, bands were transferred onto a nitrocellulose membrane and treated with Tris-buffered saline with 0.1% (v/v) Triton X-100 (TBST) containing 5% (w/v) nonfat dry milk. The membrane was probed with a 1:5,000 dilution of the specific antibody in the same buffer for 1 h and washed three times with TBST. A 1:5,000 dilution of goat antirabbit horseradish peroxidase conjugated serum (Pierce) was applied in TBST-1% milk and incubated for 1 h with the

membrane. The membrane was washed and antibody-bound protein bands were detected by enhanced chemiluminescence [12].

Substrate Gels (Zymography)

Samples were run on SDS-PAGE containing gelatin 3 mg/mL (dry weight) as a substrate. Gels were washed with 2.5% Triton X-100 for 30 min then incubated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 5 mM CaCl₂ and 0.02% NaN₃, for 12 h at 37 °C. Cleavage of the gelatin by proteases results in clear bands upon staining with Coomassie Blue R250 [12]. Plasminogen gels were prepared by adding plasminogen (50 µg/mL) to the gelatin. For preparation of casein-plasminogen gels, gelatin was replaced with 1 mg/mL casein and 10 µg/ml plasminogen.

N-Terminal Sequencing

Proteins were resolved on SDS-PAGE, electrotransferred to a PVDF membrane, and sequenced on a Perkin-Elmer Procise 491 by the Biomolecular Resource Center of the University of California, San Francisco.

Amidolytic Activity

For urokinase assays, hydrolysis of the chromogenic substrate SPECTROZYME[®] UK (Cbo-L-(γ)Glu(α-t-BuO)-Gly-Arg-pNA.2AcOH) was measured using a Thermomax Microplate ELISA Reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Ecotin-RR (2 nM) was incubated with haptoglobin (2 µM) in 50 mM Tris-HCl containing 50 mM NaCl and 10 mM CaCl₂ (pH 8.0). Following a 30-min equilibration at room temperature, two aliquots were taken for analysis. One was subjected to electrophoresis on a nondenaturing gel to observe the ecotin-haptoglobin complex formation as described [17]. U-PA (1 IU) was added to the other aliquot, and the reaction was initiated after 2 min at 37 °C by addition of SPECTROZYME[®]UK (0.2 mM, final concentration). Absorbance was followed at 450 nm.

Fibrinogen Clotting

Fibrinogen clotting was measured in the Thermomax Microplate ELISA Reader. Ecotin (1–50 µM) was incubated with *L. muta* thrombin-like enzyme (LM-TL; 2 nM) in 10 mM Tris-HCl, 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% PEG 8000 (pH 7.5). Following a 5-min equilibration at room temperature, the reaction was initiated by addition of fibrinogen 4 mg/mL (dry weight) and monitored at 405 nm as described.

Results and Discussion

Ecotin is a macromolecular inhibitor that interacts with target proteases using two distinct binding sites. These binding sites can be fine-tuned by site-directed mutagenesis to potently and specifically inhibit a specific serine protease [6–8]. In this work, we have evaluated the ecotin variants as affinity chromatography reagents as they inhibit proteases in the low nanomolar to subnanomolar range, suggesting the formation of stable complexes. The inhibitory effects of ecotin also have been observed *in vivo*, suggesting that complex formation can be achieved within rich biological mixtures [12]. The chromatographic efficiency of ecotin variants as affinity reagents was analyzed for different biological samples ranging from partially purified snake venom to tissue lysates.

Initially, we used a commercial source of human urokinase-type plasminogen activator (3,000 IU) suspended in PBS (3 mL) to examine the ability of the ecotin variants to bind proteases when attached to a matrix. U-PA was applied to an ecotin-RR (M84R, M85R) affinity column as described in “Materials and Methods.” The enzyme appeared as a diffuse band on SDS-PAGE prior to application on the column, but it was recovered as a distinct band at 52 kDa, after elution at pH 3.0 (Fig. 1a). This band was recognized by u-PA antibodies (Fig.1b) and was also fully active on plasminogen gels after elution (Fig. 1c). About 95% of the original activity was recovered, suggesting that the diffuse material represents contaminants (Fig. 1a). These results show that binding of u-PA to the ecotin-RR column is reversible and suggests that the column will be useful for purification of other serine proteases with a trypsin fold.

U-PA is a protease expressed by the PC-3 cell line, as described elsewhere [11]. The development of techniques to isolate this and other proteases derived from tissue culture cell lines is of interest for further characterizing the role of these trypsin-fold proteases in cancer progression. Thus, we used the ecotin-RR affinity column to test whether u-PA may be identified from the conditioned media of the PC-3 cell line. The supernatant from PC-3 cells grown to confluence was concentrated fourfold and loaded onto an ecotin-RR column as described in “Materials and Methods” (Fig. 2a). The eluted material appeared as one band of approximately 52 kDa on SDS-PAGE and was also observed on a gelatinplasminogen gel and by Western blotting using u-PA antibodies (Fig. 2a, inset). The N-terminal sequence of this band also confirmed it as u-PA (Table 1). This result shows that the affinity

column is effective at separating this enzyme from a mixture of proteins secreted into the culture medium by these cancer cells.

Different methods have been used to better understand ecotin binding to serine-proteases including site-directed mutagenesis, enzyme kinetics, and X-ray crystallography [18–21]. These techniques have been used to study ecotin structure–activity relationships, as well as the binding mechanism of ecotin to its target enzyme. In these experiments, amino acid substitutions and deletions in the ecotin primary secondary binding sites generated variants with different levels of potency and specificity. Wang and collaborators reported that ecotin M84R/M85R (referred to here as ecotin-RR) exhibited greater affinity to uPA, promoting a more efficient binding mode [22]. Since ecotin specificity can be tuned, it is possible to isolate trypsin-fold proteases with different specificities, providing a useful tool for dissecting the role of proteases in biological systems [6, 8, 23, 24].

The PC-3 cell line also expresses the trypsin-fold protease, MT-SP1 [12]. Unlike u-PA, MT-SP1 is not secreted and remains localized to the extracellular surface. Since ecotin-RR is a subnanomolar inhibitor of MT-SP1, we used the ecotin affinity matrix to isolate MTSP1 from solubilized cell lysates. Indeed, direct application of PC-3 Triton X-100 extracts (Fig. 2b, lane 1) allowed the capture of three high molecular weight bands (Fig. 2b, lane 2). Immunoblotting with anti-MT-SP1 antibodies confirmed the identity of the 87 kDa band as the full-length MT-SP1 protein (Fig. 2b, lane 3). Thus, ecotin-RR affinity columns allowed the isolation of uPA from the conditioned media and MT-SP1 from the solubilized cell lysates among other unknown proteins. These unknown proteins were recognized by trypsin polyclonal antibodies and presented proteolytic activity on gelatin gel (Fig. 2b, lanes 4 and 5). In order to identify some of these proteins, a different ecotin mutant column was tested, (M84R and M85P). This affinity column allowed us to identify a 67-kDa band that apparently is the same protein observed in the previous experiment analyzed with trypsin antibodies (Fig. 2b, lane 4). According to our sequencing results, this band refers to trypsin (sequence=IVGGYTCAANSI/VPYQ) bound to a serpin (sequence=TILRIIVRVNRPFLI; not shown). This complex was able to interact with the affinity column because ecotin is able to bind through two binding sites (primary and secondary sites). Therefore, despite trypsin's catalytic site being bound to a serpin, ecotin displaces the serpin or is still able to interact with this enzyme through the secondary binding site. This result is also in agreement with Takeuchi et

al (1998) that reported a Trypsinogen IV cDNA sequence in PC3 cells by using molecular biology techniques. Our data infer that this zymogen is probably expressed and activated in the cell in metastasis [12].

Urokinase plasminogen activator has also been implicated in processes such as cell migration and tissue remodeling, which require extracellular proteolytic activity [25]. Since affinity chromatography using ecotin-RR was capable of capturing u-PA in other conditions, we tested whether u-PA could be isolated from lysates of involuting mouse mammary glands. Whole-cell lysate (10 mL) was loaded onto an ecotin-RR column and incubated for 1 h as described in “Materials and Methods” (Fig. 3a). SDS-PAGE showed proteins of about 48 and 80 kDa in the material eluted at pH 3.0 that also exhibited proteolytic activity on substrate gels containing casein and plasminogen (Fig. 3a, inset). Immunoblot analysis with u-PA antibodies recognized the diagnostic 48-kDa band indicating u-PA bound to the column (Fig. 3a inset).

Interestingly, we identified the 80-kDa proteolytic activity as plasma kallikrein, and the N-terminal amino acid sequencing also revealed the presence of Hp in the same band (Table 1). Hp is a tetramer composed of two light chains (α) and two heavy chains (β) linked by disulfide bridges. The heavy β -chain is homologous to members of the mammalian serine protease family [26]. However, the catalytic triad (Ser195, His57, and Asp102) required for enzymatic activity is missing in haptoglobin, resulting in a nonenzymatic protein with a trypsin fold [26–29]. In fact, Hp is an α 2-acidic glycoprotein with hemoglobin-binding capacity, present in most body fluids of humans and other mammals [30]. Biosynthesis of haptoglobin normally occurs in the liver, but it has also been reported to be synthesized in adipose tissue and in the lung with antioxidant and antimicrobial profiles [31, 32]. Although we cannot discard the possibility of contamination from blood during collection of mammary gland cells, the large amounts of haptoglobin that were recovered by the affinity column suggest its expression by the mammary adipocytes.

Haptoglobin's trypsin fold conserves Asp193, homologous to Asp194 of serine proteases that is involved in the conformational change that takes place following proteolytic activation of the zymogen and forming a salt bridge with the N-terminal charged amino group [27]. Our results with ecotin-RR affinity chromatography and immunoassays using trypsin antibodies (3A also inset) reinforced the molecular modeling prediction of others that haptoglobin exhibits a trypsin-like structure [28,

29]. In this work, we tested the effect of human haptoglobin on ecotin inhibition of u-PA (Fig. 3b). Apparently, haptoglobin (2 μ M) does not interfere with ecotin-RR binding (2 nM) to u-PA (Fig. 3b). This result suggested that ecotin is interacting with Hp through its secondary binding site, allowing the access of the primary binding site for inhibiting proteases such as u-PA or that the haptoglobin is displaced by uPA. In addition, since (a) *in vivo* experiments showed that ecotin-RR has a half-life of about 12 h (Selvarajan, personal communication), which is unusually long for peptides and small proteins and (b) haptoglobin does not affect ecotin ability to inhibit proteases, our data also suggest that plasma haptoglobin may serve as a reservoir or carrier for ecotin in blood. Experiments incubating bovine serum with the ecotin-RR column confirmed haptoglobin as the major ecotin binding protein in the plasma, which reinforced this hypothesis (data not shown).

Finally, another source of trypsin-fold serine proteases is the Brazilian snake venom where the enzymes are involved in altering the victim's blood coagulation [17, 33, 34]. Therefore, to identify a thrombin-like enzyme on *L. muta* venom, a snake from the southeast of Brazil, a variant of ecotin was used, namely TSRR/R (V81T, T83S, M84R, M85R, and D70R) that is able to inhibit human α -thrombin.

L. muta venom (50 mg) was first partially purified on a Mono-Q (H10/10) column (Pharmacia). The non-retained material showing protease activity on gelatin gels was applied to the ecotin-TSRR/R affinity column (Fig. 4). The material eluted at pH 3.0 and exhibited a 16-kDa band on SDS-PAGE (Fig. 4, inset) and a 40-kDa band with catalytic activity on substrate gels (Fig. 4b). The N-terminal sequence of the 16-kDa band (Table 1) revealed 90% identity with the N-terminal sequence of LM-TL, a thrombin-like protein (228 aa) purified from this venom [35]. Since the literature describes the catalytic activity of the proteases of the snake venom proteins that generate peptides or small proteins as a 40-kDa band [36, 37], the inactive 16-kDa band may be a degradation product. In order to verify the identity of the 40-kDa band, we purified LM-TL from *L. muta* venom using the original method [35] and tested for inhibition of its proteolytic activity by the ecotin variant, using a fibrinoclotting assay. Ecotin TSRR/R inhibited LM-TL fibrinoclotting activity with an IC₅₀ of 10 μ M (Fig. 4c). Since ecotin can form a stable complex with LM-TL, the structural characterization of this enzyme may be facilitated, since ecotin-protease complexes are often easier to crystallize than the proteases alone [29].

Final Remarks

In summary, this work showed that ecotin variants are able to interact with a diverse array of serine proteases and may be used to isolate and characterize proteases from diverse biological samples. This technique should not only assist in the isolation of proteases but may also be useful for identifying proteases and homologous proteins in structural, pharmacological, and biological studies using different biological samples.

Acknowledgments We thank the support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Docente (CAPES), and Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal Fluminense (UFF) for the financial support and H.C.C. and P. S. fellowships. TT and CSC were supported by NIH grant CA072006. We also thank Dr. Sushma Selvarajan for donating the mammary gland extracts.

References

- [1] Krarup, A. Wallis, R. Presanis, J.S. Gal, P. Sim, R.B. (2007). *PLoS ONE*, 2, e623.
- [2] Dass, K. Ahmad, A. Azmi, A.S. Sarkar, S.H. Sarkar, F.H. (2008). *Cancer treatment reviews*, 34, 122-36.
- [3] Parmar, N. Albisetti, M. Berry, L.R. Chan, A.K. (2006). *Clinical laboratory*, 52, 115-24.
- [4] Watson, C.J. (2006). *Expert reviews in molecular medicine*, 8, 1-15. Review.
- [5] Lima, D.C. Alvarez Abreu, P. de Freitas, C.C. Santos, D.O. Borges, R.O. Dos Santos, T.C. Mendes Cabral, L. Rodrigues, C.R. Castro, H.C. (2005). *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2, 39-47.
- [6] Castro, H.C. Monteiro, R.Q. Assafim, M. Loureiro, N.I. Craik, C. Zingali, R.B. (2006). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38, 1893-900.
- [7] McGrath, M.E. Gillmor, S.A. Fletterick, R.J. (1995). *Protein science*, 4, 141-148.
- [8] Yang, S.Q. Cheng-I, W. Gillmor, S.A. Fletterick, R.J. Craik, C.S. (1998). *Journal of molecular biology*, 279, 945-957.
- [9] Lengyel, Z. Pal, G. Sahin-Toth, M. (1998). *Protein expression and purification*, 12, 291-294.
- [10] Kaighn, M.E. Narayan, K.S. Ohnuki, Y. Lechner, J.F. Jones, L.W. (1979). *Investigative urology*, 17, 16-23.
- [11] Yoshida, E. Verrusio, E.N. Mihara, H. Oh, D. Kwaan, H.C. (1994). *Cancer research*, 54, 3300-3304.
- [12] Takeuchi, T. Shuman, M.A. Craik, C.S. (1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 11054-11061.
- [13] Nukumi, N. Iwamori, T. Kano, K. Naito, K. Tojo, H. (2007). *Journal of cellular physiology*, 213, 793-800.
- [14] Castro, H.C. Zingali, R.B. Albuquerque, M.G. Pujol-Luz, M. Rodrigues, C.R. (2004). *Cellular and molecular life sciences*, 61, 843-56.
- [15] Links auf dem Keller, U. Doucet, A. Overall, C.M. (2007). *Biological chemistry*, 388, 1159-62.
- [16] Laemmli, U.K. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
- [17] Oliveira-Carvalho, A.L. Guimarães, P.R. Abreu, P.A. Dutra, D.L. Junqueira-de-Azevedo, I.L. Rodrigues, C.R. Ho, P.L. Castro, H.C. Zingali, R.B. (2008). *Toxicon*, 51, 659-71.
- [18] Polticelli, F. Bocedi, A. Minervini, G. Ascenzi, P. (2008). *The FEBS journal*, 275, 5648-56.
- [19] Davis, D.R. Wilson, K. Sam, M.J. Kennedy, S.E. Mackman, N. Charlesworth, J.A. Erlich, J.H. (2007). *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42, 559-71.
- [20] Saeed, S.A. Ahmad, N. Ahmed, S. (2007). *Biochemical and biophysical research communications*, 353, 915-20.
- [21] Nielsen, M.J. Petersen, S.V. Jacobsen, C. Thirup, S. Enghild, J.J. Graversen, J.H. Moestrup, S.K. (2007). *The Journal of biological chemistry*, 282, 1072-9.
- [22] Ettrich, R. Brandt, W. Kopecký, J. V. Baumruk, V. Hofbauerová, K. Pavlíček, Z. (2002). *Biological chemistry*, 383, 1667-76.
- [23] Friedrichs, W.E. Navarajo-Ashbaugh, A.L. Bowman, B.H. Yang, F. (1995). *Biochemical and biophysical research*, 209, 250-256.
- [24] Yang, F. Friedrichs, W.E. Navarajo-Ashbaugh, A.L. deGraffenried, L.A. Bowman, B.H. Coalson, J.J. (1995). *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 73, 433-439.

- [25] Maruyama, M. Sugiki, M. Yoshida, E. Mihara, H. Nakajima, N. (1992). *Toxicon*, 30, 853-864.
- [26] Zhang, Y. Wisner, A. Maroun, R.C. Choumet, V. Xiong, Y. Bon, C. (1997). *The Journal of biological chemistry*, 272, 20531-20537.
- [27] Silveira, A.M. Magalhães, A. Diniz, C.R. de Oliveira, E.B. (1987). *The International journal of biochemistry*, 103, 596-605.
- [28] Paine, M.J. Desmond, H.P. Theakston, R.D. Crampton, J.M. (1992). *The Journal of biological chemistry*, 32, 22869 -22876.
- [29] Usami, Y. Fujimura, Y. Miura, S. Shima, H. Yoshida, E. Yoshioka, A. Hirano, K. Suzuki, M. Titani, K. (1994). *Biochemical and biophysical research communications*, 201, 331-339.
- [30] Jin, L. Pandey, P. Babine, R.E. Gorga, J.C. Seidl, K.J. Gelfand, E. Weaver, D.T. Abdel-Meguid, S.S. Strickler, J.E. (2005). *The Journal of biological chemistry*, 280, 4704-12.
- [31] McGrath, M.E. Erpel, T. Browner, M.F. Fletterick, R.J. (1991). *Journal of molecular biology*, 222, 139-142.
- [32] McGrath, M.E. Hines, W.M. Sakanari, J.A. Fletterick, R.J. Craik, C.S. (1991). *The Journal of biological chemistry*, 266, 6620-6625.
- [33] Erpel, T. Hwang, P. Craik, C.S. Fletterick, R.J. McGrath, M.E. (1992). *Journal of bacteriology*, 174, 1704-1710.
- [34] Zhu, L. Song, L. Chang, Y. Xu, W. Wu, L. (2006). *Fish & shellfish immunology*, 20, 320-331.
- [35] Wang, C.I. Yang, Q. Craik, C.S. (1995). *The Journal of biological chemistry*, 270, 12250-6.
- [36] Laboissière, M.C. Young, M.M. Pinho, R.G. Todd, S. Fletterick, R.J. Kuntz, I. Craik, C.S. (2002). *The Journal of biological chemistry*, 277, 26623-26631.
- [37] Eggers, C.T. Murray, I.A. Delmar, V.A. Day, A.G. Craik, C.S. (2004). *The Biochemical journal*, 379, 107-18.
- [38] Greer, J. (1998). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 3393-7.
- [39] Eschenlauer, S.C. Faria, M.S. Morrison, L.S. Bland, N. Ribeiro-Gomes, F.L. DosReis, G.A. Coombs, G.H. Lima, A.P. Mottram, J.C. (2009). *Cellular microbiology*, 11, 106-20.
- [40] Shang, X.J. Yao, G. Ge, J.P. Sun, Y. Teng, W.H. Huang, Y.F. (2009). *Journal of Andrology*, 30, 122-6.
- [41] Toy, E.P. Azodi, M. Folk, N.L. Zito, C.M. Zeiss, C.J. Chambers, S.K. (2009). *Neoplasia*, 11, 136-44.
- [42] Buehler, P.W. Abraham, B. Vallelian, F. Linnemayr, C. Pereira, C.P. Cipollo, J.F. Jia, Y. Mikolajczyk, M. Boretti, F.S. Schoedon, G. Alayash, A.I. Schaer, D.J. (2009). *Blood*, Epub ahead of print.

Table 1: N-Terminal sequence of proteins from retained material of supernatant of cancer cells, mammary gland cell lysate, and snake venom. Protein identification was determinate using the Swiss Protein Data Base.

Source	Sequence	Identity
Prostate cancer cells	IIGGEFTTIENQPWFFAAIY	u-PA
Mammary gland lysate	IELGNDDAKGEFDWQAKMIS	Haptoglobin α -chain
	VIGGSMAMDFSDPSXPKPPE	Haptoglobin β -chain
Snake venom	VVGDEXNINEHRXLVLVYX	LM-TL

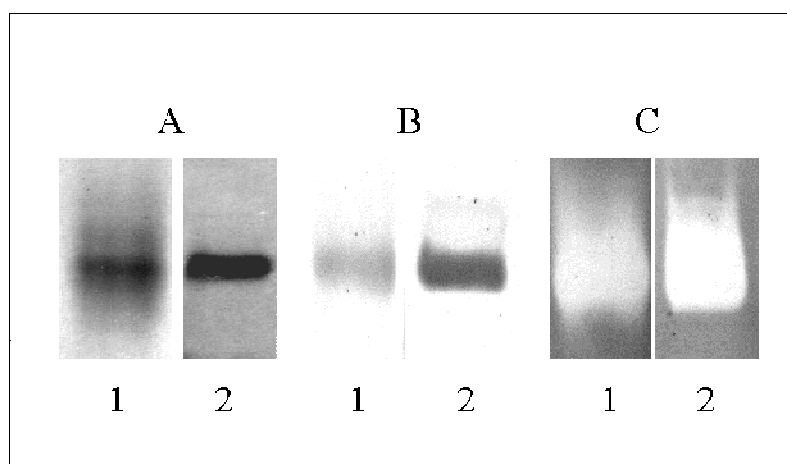


Figure 1: Analysis of commercial u-PA using ecotin-RR affinity column. SDS-PAGE (A), Western blot analysis (B), and plasminogen-gelatin gels (C) of commercial u-PA before application on the ecotin-RR column (lane 1) and after elution at pH 3.0 (lane 2). Each lane contains 5 μ g of enzyme

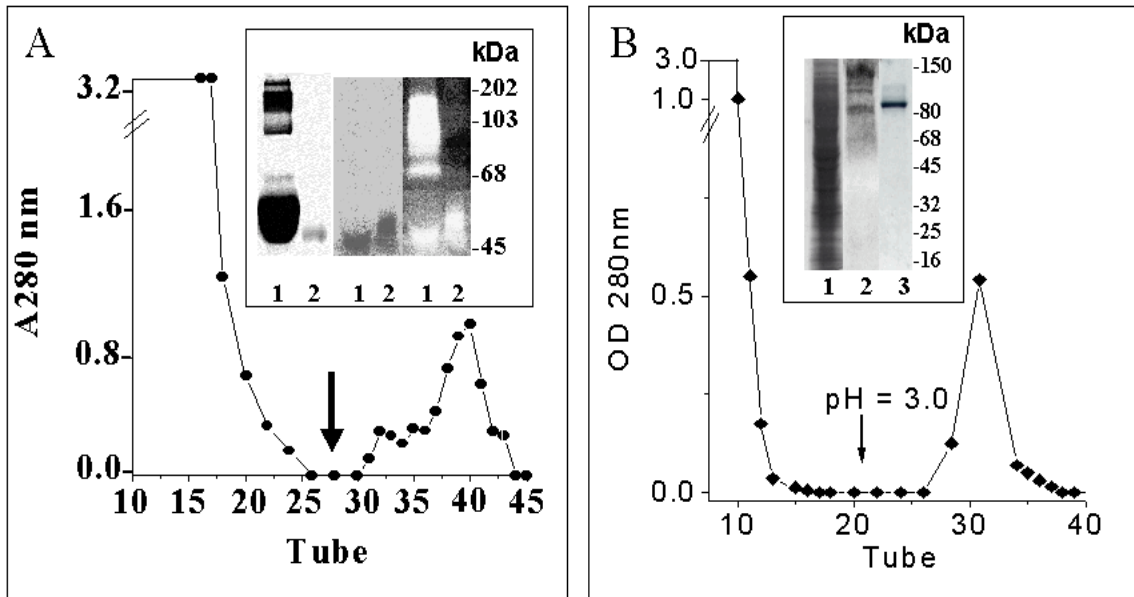


Figure 2: Analysis of prostate cancer cells (conditioned medium (A) and membrane (B)) using the ecotin-RR affinity column. A Elution pattern of conditioned medium from prostate cancer cells. The graph shows the elution profile (1 mL/fraction) following application of 10 mL of concentrated conditioned medium of untreated cancer cells to a column equilibrated with PBS pH 7.5. Arrow indicates the beginning of the elution step using 50 mM glycine in 100 mM NaCl, pH 3.0. Inset SDS-PAGE (left), Western blot using u-PA polyclonal antibodies (center), and plasminogen-gelatin gels (right) of untreated medium from cancer cell cultures (lane 1) and material eluted at pH 3.0 from the ecotin-RR column (lane 2). Each lane contains 8 μ g of sample protein. B Analysis of eluted material from Tween-extracted cell membrane from Prostate cancer cells (PC3) on ecotin-RR column. Arrow indicates when elution buffer was loaded. Inset SDS-PAGE (10%) of extracted cell membrane material (lane 1), affinity eluate (lane 2), immunoreactivity probed with MTSP1 antibodies (lane 3), with trypsin polyclonal antibodies (lane 4), and proteolytic activity on gelatin gel (lane 5).

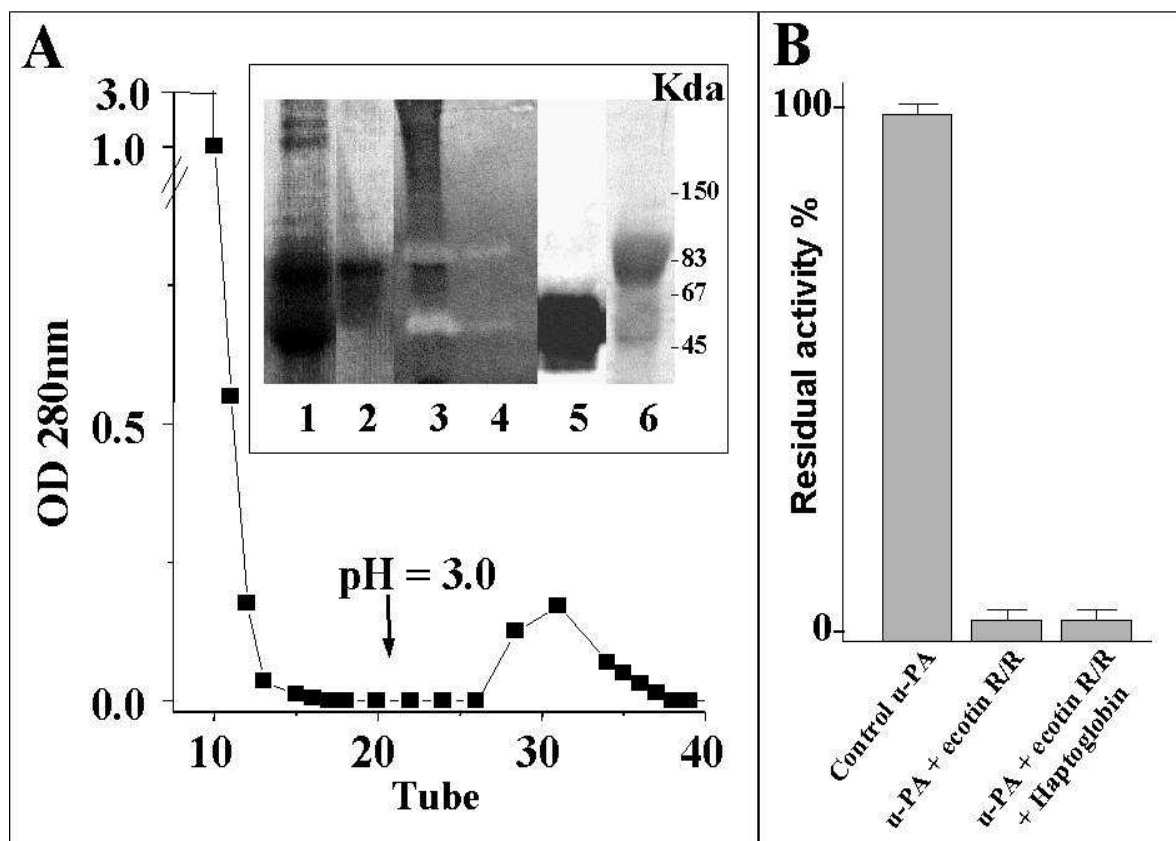


Fig. 3 Analysis of mammary gland lysate using the ecotin-RR affinity column. A Elution profile following application of 10 mL of sample to the column. Fractions 2 mL/min. Arrow indicates the beginning of the elution at pH 3.0. Inset SDS-PAGE (left) and substrate gels (right). Lanes 1 and 3 Whole mammary gland; lanes 2 and 4 lysate material eluted at pH 3.0 from the ecotin-RR column; lanes 5 and 6 Western blot analysis of retained material on affinity column using u-PA antibodies and trypsin antibodies, respectively. Each lane contains 10 μ g of protein. B Influence of haptoglobin (2 μ M) on the inhibitory effect of ecotin-RR (2 nM) upon hydrolysis of chromogenic substrate by u-PA. Experimental conditions are described in "Materials and Methods." Residual activity is expressed as a percentage of the control Δ A405/min observed in control u-PA. Values are means \pm SD of three independent experiments

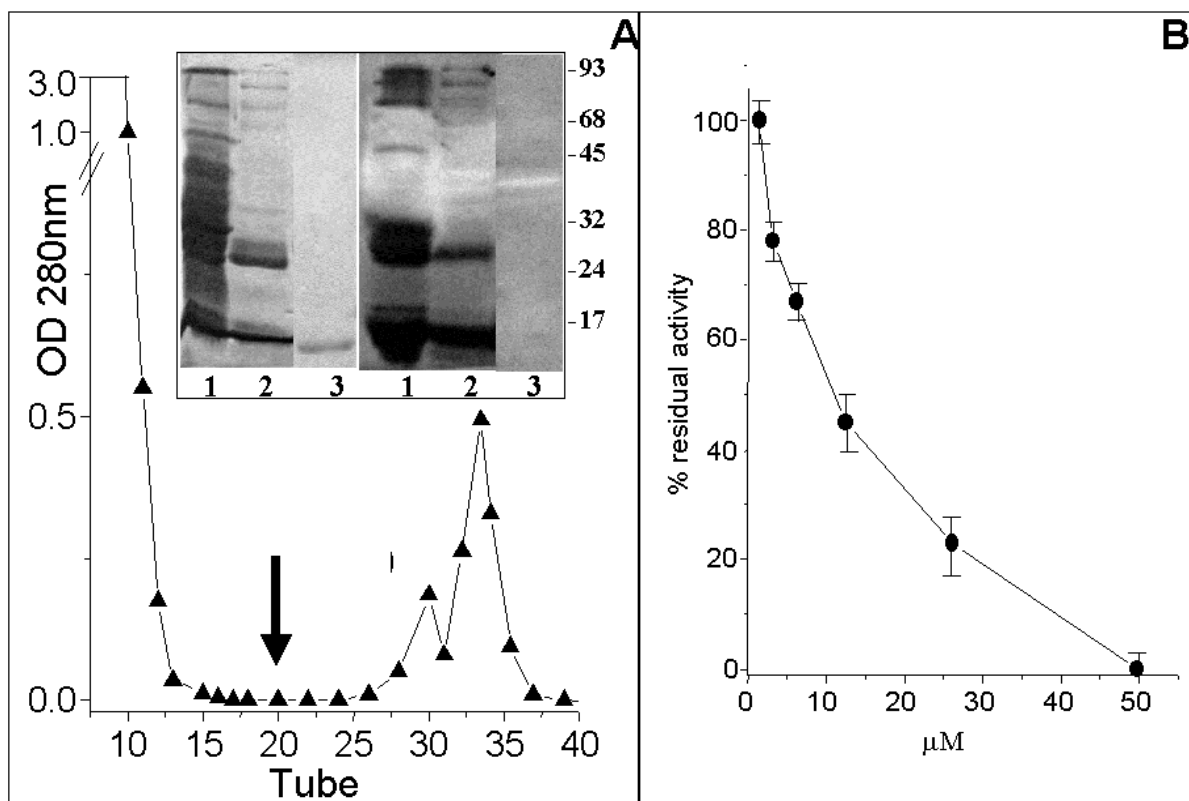


Fig. 4 Analysis of snake venom using an ecotin-TSRR/R affinity column. A Elution profile of a partially purified *L. muta* venom the snake venom was partially purified on a Mono-Q column (FPLC) and the nonretained material was applied to an ecotin-TSRR/R affinity column as described in "Materials and Methods." Arrow indicates the beginning of the elution step. Inset: SDS-PAGE (left) and substrate gel (right). Lane 1 crude venom; Lane 2 non-retained material from Mono-Q column; Lane 3 material eluted at pH 3.0 from ecotin-TSRR/R column. Each lane contains 10 μg of protein. B Inhibitory effect of ecotin-TSRR/R upon fibrinoclotting activity of purified LM-TL. The enzyme (60 nM) was preincubated for 5 min at room temperature with different concentrations of ecotin-TSRR/R (1–50 μM). Fibrinogen (4 mg/mL) was then added to the assay, and the absorbance at 405 nm was recorded continuously. Residual activity is expressed as a percentage of the control $\Delta\text{A}405/\text{min}$ observed in the absence of the ecotin. Values are means \pm SD of three independent experiments

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](#)