UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JANNISON KARLLY CAVALCANTE RIBEIRO

Novas propriedades do SKTI (Inibidor de tripsina de soja): Inibição para elastase neutrofílica humana e efeitos no processo de injúria pulmonar aguda.

NATAL/RN

MAIO - 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

JANNISON KARLLY CAVALCANTE RIBEIRO

Novas propriedades do SKTI (Inibidor de tripsina de soja): Inibição para elastase neutrofílica humana e efeitos no processo de injúria pulmonar aguda.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOQUÍMICA.

ORIENTADOR: MAURÍCIO PEREIRA DE SALES

NATAL/RN

MAIO-2010

Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Ribeiro, Jannison Karlly Cavalcante.
Novas propriedades do SKTI (inibidor de tripsina de soja): inibição para elastase neutrofílica humana e efeitos no processo de injúria pulmonar aguda / Jannison Karlly Cavalcante Ribeiro. – Natal, RN, 2010.

82 f.; Il.

Orientador: Maurício Pereira de Sales.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Elastase neutrofílica – Dissertação. 2. Inibidores de proteinases – Dissertação. 3. Injúria pulmonar – Dissertação. I. Sales, Maurício Pereira de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB CDU 544.475

JANNISON KARLLY CAVALCANTE RIBEIRO

NOVAS PROPRIEDADES DO SKTI (INIBIDOR DE TRIPSINA DE SOJA): INIBIÇÃO PARA ELASTASE NEUTROFÍLICA HUMANA E EFEITOS NO PROCESSO DE INJÚRIA PULMONAR AGUDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 07/05/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientador

Profª. Drª. Ilka Maria Vasconcelos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
1º Examinador

Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha
Departamento de Bioquímica – UFRN
2º Examinador

Agradeço de forma especial ao professor e amigo ***Maurício Pereira de Sales*** *pela realização e concretização deste sonho e por mais esta etapa finalizada em minha vida. Como professor Maurício, seus ensinamentos, experiência e visão bioquímica foram de grande valia nos momentos de dificuldade, não medindo esforços para finalização desta obra, tanto financeiros quanto intelectuais, sempre com a postura exemplar de um profissional e pesquisador o qual me espelho para um dia conseguir ter um pouco da competência e compromisso atribuídos á ele mesmo diante de tantas adversidades. Como o amigo, seria impossível descrever minha gratidão durante esta caminhada. Mesmo diante de tantos altos e baixos, o amigo Maurício nunca deixou de crer em meu potencial como aluno e principalmente nunca deixou que eu desistisse dos meus sonhos e de mim mesmo durante tantos altos e baixos em minha vida, sempre me perdoando, estimulando e me dando um voto de confiança quando tudo parecia sem solução. Hoje, meu sentimento é de absoluta felicidade e compromisso com meu lado profissional e minha vida, graças à esforços mil relacionados a superação e responsabilidades, que com certeza não foram em vão. Meu muito obrigado professor/amigo Maurício, hoje sou uma pessoa em constante mudança diária, cheio de sonhos pessoais e entusiasmo pela pesquisa graças a você.*

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que escrevo meus agradecimentos a todas as pessoas de extrema importância na minha vida pessoal e profissional que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais essa importante etapa em minha vida.

Primeiramente agradeço ao meu poder superior que concebo como ***Deus****, por não me dar nada a mais do que sempre lhe pedi em orações: força, fé e esperança para enfrentar as adversidades, força para modificar as coisas que estavam ao meu alcance e sabedoria para reconhecer as coisas que não poderia modificar. Sem o direcionamento e o redescobrimento da minha espiritualidade teria se tornado impossível realizar esta obra. Obrigado meu Deus.*

Em segundo lugar, não posso deixar de agradecer ao amor, confiança força e amor depositados em mim pelos meus pais: ***João Alberto Ribeiro Cavalcante*** *e* ***Maria Lindaura Cavalcante Ribeiro****, que mesmo distantes nunca foram tão presentes em minha vida estando sempre ao meu lado me dando apoio e suporte nos momentos de dificuldade e vibrando comigo minhas conquistas. Redescobri a importância, amizade e lealdade para com meus pais. Obrigado pelo amor e esforços tanto financeiros quanto amorosos para que eu nunca esquecesse que sou um vencedor. Que Deus sempre me proporcione à oportunidade de conseguir cada vez mais vitórias para que eu sempre possa deixá-los orgulhosos dos meus feitos. Não existem palavras para descrever meu amor por vocês, humildemente agradeço. Amo vocês.*

Aos meus ***irmãos****, Janne, Júnior, Jeanne e Paulo, pelo amor, companheirismo e cumplicidade que fortalece nossos laços a cada dia. Sem vocês também teria sido impossível a conclusão desta etapa em minha vida. Amo vocês.*

Aos professores componentes da ***banca examinadora.*** *Dra. Ilka Maria Vasconcelos, pela amizade, confiança e admiração pelos trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e seus imprescindíveis comentários sempre enriquecedores para a valorização e aperfeiçoamento deste trabalho. Dr. Hugo*

Rocha pela amizade e companheirismo profissional diários, além de seus admiráveis conhecimentos e experiências enriquecedores tantas vezes comprovados através da sua pesquisa e crescimento ascendente no âmbito da pesquisa sempre aliados ao seu bom humor e profissionalismo.

Aos professores componentes da ***banca de qualificação,*** *Dra. Adriana Uchôa, Dr. Elizeu Antunes e Dra Ana Heloneida, pela atenção, esforço e ajuda indispensáveis para o aperfeiçoamento desta dissertação sempre dispondo de ajuda nos momentos de dúvida ou auxílios nos momentos de dificuldade.*

Ao Prof. Dr. ***Elizeu Antunes dos Santos****, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela amizade, momentos de descontração, esclarecimentos de dúvidas e pelo crescimento profissional e pessoal proporcionados com o seu convívio*

A médica e amiga ***Prof. Jacy Fook****, pelo incentivo e amizade acumulados durante todo meu processo acadêmico.*

Aos demais ***Professores****, Giulliana, Luiz, Luciana, Edda, Selma, Dilma, Fernanda, Suely, João Paulo, Roberto e Felipe, assim como aos Funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Eliene e Jonas, pela preciosa amizade, competência profissional, e que de alguma forma contribuíram para a execução dessa tarefa.*

A Dra. ***Magda Fabiana****, farmacêutica do hospital José C. Passos, pelo auxílio no processamento das amostras sanguíneas e uso do citômetro de fluxo no ensaio de citotoxicidade.*

A Profª. Drª. ***Adeliana Oliveira****, pelo conhecimento responsável pelos meus primeiros passos dessa longa jornada no LQFPB, assim como pela amizade e pela companhia em muitos sábados e domingos de trabalha no laboratório. Muitas vezes confidente e amiga sincera nas adversidades nunca negando ajuda quando tanto precisava seja no laboratório seja durante a realização de experimentos.*

A minha amiga ***Dayse****, companheira durante toda a graduação e amiga leal durante o mestrado. Teria sido impossível a realização deste trabalho sem sua*

ajuda tanto nos experimentos tanto na compreensão das dificuldades vividas. Não me restam dúvidas que seguiremos juntos nesta longa caminhada que com certeza apenas se inicia neste momento. Muito obrigado.

Ao ***Norberto****, companheiro antigo de laboratório de uma sinceridade e lealdade ímpar. Obrigado pelos conselhos e pelos momentos divertidos proporcionados a todos nós do LQFPB. Admiro sua força de vontade, sucesso.*

A ***Sheyla****, que apareceu sem pedir licença em nossas vidas e rapidamente se estabeleceu com seu jeito amável, responsável e CHIQUE de ser. Sou grato por ter tido a oportunidade de ser seu amigo e companheiro nos momentos difíceis do seu mestrado, que sem dúvida alguma, graças a sua competência resultou em um enorme sucesso. Saudades.*

A ***Luciana Rabelo****, antes uma estranha, hoje uma amiga que se mostrou extremamente competente e dedicada com sua pesquisa, mesmo durante momentos atribulados vividos durante o mestrado. Obrigado por ter entrado em minha vida e de "quebra" ter trazido o Lucas também. Te adoro.*

A ***Ticiana Amorim****, pela serenidade e momentos agradáveis. Nosso laboratório torna-se mais feliz com seu retorno. Sucesso em sua nova caminhada.*

A ***Patrícia****, companheira de laboratório e mais recente doutoranda. Obrigado pelo auxílio quando foi necessário, demonstrando seu coleguismo para com todo o grupo de pesquisa. Sua presença enriquece nosso laboratório.*

Ao ***Cleysyvan****, pela prontidão em nos ajudar nos momentos mais decisivos de nossos experimentos e auxílio na árdua tarefa de administrar as burocracias referentes ao laboratório. Parabéns pela conquista do seu mestrado.*

A companheira de mestrado ***Roberta Godoni****, que mesmo antes de ser integrante do LQFPB, já se mostrava amiga, honesta e competente. É um prazer tê-la como amiga.*

Agradeço também aos demais ***colegas de mestrado****, pelo esforço e dedicação durante o curso, auxílio nas dúvidas e dificuldades e por acreditarem em meu potencial sempre incentivando meu sucesso. Obrigado por conviver com uma*

turma tão excelente,amiga e com certeza a mais bacana que já passou pelo DBQ!

A meus amigos ***Rafaela*** *e* ***Raphael*** *pela atenção e o respeito em aceitarem minhas dicas como facilitador do aprendizado em bioquímica e pela ajuda na manutenção do biotério de camundongos, garantido sempre animais de qualidade para a excelência de nossos experimentos. Tenho certeza da qualidade, dedicação e plena confiança em seus primeiros passos e ao mesmo tempo tão exigentes durante esta iniciação científica.*

A ***Kalline****,* ***Richelle*** *e* ***Alexandre****, pelo companheirismo, admiração e amizade sempre constantes no dia-a-dia.*

Ao ***Phelippe****, aluno de iniciação científica, pela descontração, competência e pelos momentos agradáveis vividos em sua presença, que em tão pouco tempo se tornou uma peça indispensável para o grupo.*

Aos demais e mais recentes companheiros de laboratório que recentemente iniciaram sua caminhada no LQFPB. Boa sorte à todos.

Aos demais amigos que passaram pelo Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas e que de certa forma contribuíram para realização deste trabalho,Fábio Mascena, Ana Celly, Daniele, Katya Anaya, Gioconda Moura, Anne Shyrley e Anny Aquino, Raniere Moura, Fabiano Teixeira, Ibson Lucas, Ítalo Maia, Hugo Henrrique, Joelma Pitanga, André Luiz, Lúcia Betânia, Lussandra Thaís, Carina Leite, Carlos Maia, Alexandre Queiroz.

Ao grupo de pesquisa ***BIOPOL****, pela ajuda mútua e companheiros de pesquisa, sem contar na presença maravilhosa de seus integrantes tão especiais como: Ruth, Diego, Sara, Nedinaldo, Rafael, Jailma, Gabriel, Leonardo, Raniere, Cinthia, Sayonara, Arthur, Leandro, Kaline e demais. Espero que nossos laços se estreitem ainda mais.*

A todo o laboratório da ***professora Selma****, por gentilmente sempre nos receber e auxiliar em experimentos, dicas e disponibilidade de uso do seu espaço. Espero que nossa parceria na pesquisa cresça ainda mais. Também agradeço a*

pessoas que fazem deste laboratório um lugar especial, como ***Virgínia****, que revelou-se como um braço direito nos momentos difíceis, auxiliando-me em muitas dificuldades. Sempre serei gato, obrigado "gatona";* ***Willianne*** *que com seu jeito doce e amável que contagia qualquer local por onde passa, serei sempre grato por tudo que você fez por mim e por toda confiança depositada, você está em um local VIP no meu coração. E os demais componentes Carlos, Núbia, Sérgio, Glória e demais pelos momentos agradáveis durante todo este tempo no DBQ.*

Aos demais colegas de departamento e funcionários, sempre garantindo um ambiente adequado e organizado indispensáveis para o bem estar do nosso cotidiano no ambiente de trabalho.

A turma de ***Biomedicina 2004.2****, minha querida turma, pelos momentos inesquecíveis vividos nesses quase 5 anos, em especial Renato e Ilana que me ajudaram na realização dos ensaios de citotoxicidade. Saudades eternas.*

As demais turmas de Biomedicina, pela amizade e admiração profissional.

Ao ***PPG do departamento de Bioquímica*** *e agências* ***Capes e Finep,*** *pela oportunidade de concluir minha pós-graduação. Sinto-me honrado em fazer parte deste programa.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (****CNPq****), pelo incentivo financeiro durante minha iniciação científica e durante meu mestrado.*

"Gatinho de Cheshire", começou, muito timidamente, por não saber se ele gostaria desse tratamento: ele, porém, apenas alargou um pouco mais o sorriso. "Ótimo, até aqui está contente", pensou Alice. E prosseguiu: "Você poderia, por favor, me dizer qual é o caminho para sair daqui?" "Depende muito de onde você quer chegar", disse o Gato. "Não me importa muito onde...", foi dizendo Alice. "Nesse caso não faz diferença por qual caminho você vá", disse o Gato. "... desde que eu chegue a algum lugar", acrescentou Alice, explicando. "Oh, esteja certo de que isso ocorrerá", falou o Gato, "desde que você caminhe o bastante"

[Lewis Carroll – Alice no País das Maravilhas]

" Foi o tempo que perdi com a minha rosa
que a fez tão importante."

[Antoine de Saint-Exupéry]

RESUMO

Sementes de leguminosas são conhecidas como uma rica fonte de inibidores de proteinases, destacando-se dentre estes o inibidor de tripsina da soja (SKTI) que é uma proteína amplamente estudada e caracterizada para muitas propriedades biológicas. Entretanto seus efeitos aplicados a desordens inflamatórias ainda são pouco conhecidos. SKTI foi purificado à partir de uma fração comercial de soja através de cromatografia de troca aniônica em Resource Q. A proteína purificada foi capaz de inibir a elastase de neutrófilos humanos (ENH) e a tripsina bovina. O valor da sua IC_{50} foi de 8 $\mu g.mL^{-1}$ (0.3 nM) e nessa concentração o SKTI não foi capaz de provocar efeitos hemolíticos ou citotóxicos sobre as populações celulares sanguíneas humanas. Por meio do modelo de toxicidade sistêmica aguda, utilizando camundongos, também não foram observados efeitos deletérios sobre órgãos, células sanguíneas e alterações nos níveis das enzimas hepáticas aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT). Neutrófilos humanos incubados com SKTI na concentração de 0.3 nM apresentaram uma diminuição da liberação de ENH quando estimulados pelos ativadores PAF e fMLP (83,1% e 70 %, respectivamente). Estes resultados mostram que o SKTI foi capaz de afetar ambas as vias PAF/fMLP de liberação de ENH, sugerindo esta proteína como um possível antagonista dos receptores PAF/fMLP. Modelos *in vivo* de injúria pulmonar aguda mediante estimulação por LPS de *Escherichia. coli* demonstraram uma supressão significativa dos eventos inflamatórios atribuídos à atividade elastásica de forma dose dependente. Cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina confirmaram a diminuição da inflamação tecidual. Estes resultados sugerem que o SKTI pode ser indicado como um potencial agente farmacológico na terapia de muitas doenças inflamatórias.

Palavras chave: Elastase neutrofílica. SKTI. Kunitz. *Glycine max*. Injúria pulmonar.

ABSTRACT

Seeds from legumes including the *Glycine max* are known to be a rich source of protease inhibitors. The soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) has been well characterised and has been found to exhibit many biological activities. However its effects on inflammatory diseases have not been studied to date. In this study, SKTI was purified from a commercial soy fraction, enriched with this inhibitor, using anion exchange chromatography Resource Q column. The purified protein was able to inhibit human neutrophil elastase (HNE) and bovine trypsin. . Purified SKTI inhibited HNE with an IC_{50} value of 8 µg (0.3 nM). At this concentration SKTI showed neither cytotoxic nor haemolytic effects on human blood cell populations. SKTI showed no deleterious effects on organs, blood cells or the hepatic enzymes alanine amine transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST) in mice model of acute systemic toxicity. Human neutrophils incubated with SKTI released less HNE than control neutrophils when stimulated with PAF or fMLP (83.1% and 70% respectively). These results showed that SKTI affected both pathways of elastase release by PAF and fMLP stimuli, suggesting that SKTI is an antagonist of PAF/fMLP receptors. In an *in vivo* mouse model of acute lung injury, induced by LPS from *E. coli*, SKTI significantly suppressed the inflammatory effects caused by elastase in a dose dependent manner. Histological sections stained by hematoxylin/eosin confirmed this reduction in inflammation process. These results showed that SKTI could be used as a potential pharmacological agent for the therapy of many inflammatory diseases

Keywords: Neutrophil elastase. SKTI. Kunitz. *Glycine max*. Pulmonary injury.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**.....	20
1.1	INIBIDORES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.....	20
1.2	INIBIDORES DE PROTEINASES CLASSIFICAÇÃO.....	21
1.3	INIBIDORES DE PROTEINASES SERÍNICAS.....	22
1.4	ELASTASE NEUTROFÍLICA HUMANA (ENH).....	24
1.5	PATOLOGIAS RELACIONADAS À DISFUNÇÃO DA ELASTASE DE NEUTRÓFILOS.....	26
1.6	ENVOLVIMENTO DOS NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES NO PROCESSO INFLAMATÓRIO	27
1.7	INJÚRIA PULMONAR	31
1.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
2	**OBJETIVOS**.....	35
3	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	36
3.1	MATERIAL.....	36
3.1.1	**Material biológico**.....	36
3.1.2	**Reagentes**.....	36
3.1.3	**Equipamentos**.....	37
3.2	MÉTODOS.....	38
3.2.1	**Preparo da fração rica em SKTI**.....	38

3.2.2 **Determinação da concentração de proteínas.....** 38

3.2.3 **Purificação do inibidor de elastase de ENH.....** 38

3.2.4 **Preparo das soluções usadas como substratos** 39

3.2.4.a **Azocaseína 1%.....** 39

3.2.4.b **SAAVNA 150 mM.....** 39

3.2.4.c **BApNA 1,25 mM.....** 39

3.2.5 **Determinação da atividade anti-elastásica neutrofílica.....** 39

3.2.6 **Caracterização do inibidor de ENH purificado.....** 40

3.2.6.a **Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....** 40

3.2.6.b **Especificidade de SKTI para enzimas de diversas fontes.....** 41

3.2.6.c **Determinação do IC_{50} do SKTI.....** 43

3.2.7 **Ensaio de citotoxicidade e atividade hemolítica para o SKTI.....** 44

3.2.8 **Efeito do inibidor sobre a liberação de ENH por PAF e fMLP.....** 44

3.2.9 **Injúria pulmonar aguda em camundongos induzida por LPS** 45

3.2.10 **Hemorragia pulmonar em camundongos induzida por LPS** 46

3.2.11 **Medição da atividade elastásica dos extratos pulmonares** 46

3.2.12 **Ensaio de toxicidade aguda sistêmica** 47

3.2.13 **Análises estatísticas** 47

4 RESULTADOS..... 48

4.1 Purificação, caracterização e ensaios *in vitro* 48

4.1.1 **Cromatografia de troca aniônica Resource Q .....** 48

4.1.2 **Eletroforese em gel de poliacrilamida .....** 49

4.1.3 **Determinação da massa molecular por SDS-PAGE.....** 50

4.1.4 **Determinação da massa molecular por filtração em gel Sephadex 75 10 300 GL (AKTA purifier).** 50

4.1.5 **Determinação do IC_{50} do SKTI para elastase de neutrófilos humanos.....** 51

4.1.6 **Especificidade do SKTI para enzimas proteolíticas .....** 51

4.1.7 **Citotoxicidade e atividade hemolítica do SKTI para sangue periférico humano.** 52

4.1.8 **Ensaio de inibição da liberação de ENH mediante estimulação por PAF e fMLP.** 53

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS 54

4.2.1 **Injúria pulmonar aguda em camundongos induzida por LPS** 54

4.2.2 **Avaliação da hemorragia pulmonar em camundongos induzida por LPS** 56

4.2.3 **Atividade elastásica residual dos extratos pulmonares** 57

4.2.4 **Análises histopatológicas** 57

4.2.5 **Ensaio de toxicidade aguda sistêmica em camundongos** 60

5 **DISCUSSÃO**..... 61

6 **CONCLUSÕES**..... 65

REFERÊNCIAS 66

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

ALT – Alanina amino tranferase.

AST- Aspartato amino tranferase.

ATT- α1-Antitripsina.

BApNa - N-α-benzoil-arginina-p-nitroanilida.

BSA - Albumina sérica bovina.

C5a - Fator complemento C5a.

DMSO - Dimetilsulfóxido.

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético.

ENH - Elastase de neutrófilos humanos.

fMLP - N-formil-methionil-leucil-fenilalanina.

GMSF – Fator estimulador coronariano de granulócitos e macrófagos.

IC_{50} - Quantidade de inibidor capaz de inibir em 50% a atividade da enzima.

ICAM 1 - Molécula-1 de adesão intercelular.

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeos (*E. coli*)

LTB4 - Leucotrieno B_4.

PAF - Fator ativador de plaquetas.

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida.

PBS - Phosphate buffer solution (Tampão fosfato).

PMNs - Neutrófilos polimorfos nucleares.

PPI - Inibidor tipo Kunitz do mamão.

Rf - Mobilidade relativa.

SAAVpNA - N-succinil-L-alanil-L-valina-p-nitroanilida.

SDS - Dodecil sulfato de sódio.

SKTI - Inibidor de tripsina tipo Kunitz da soja.

SLPI – Inibidor de leucoproteases de secreção

TCA - Ácido tricloroacético.

TEMED - N, N, N',N'-tetrametiletilinodiamino.

TGF-β - Fator beta de transformação e crescimento.

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteases

TNF-α - Fator de necrose tumoral.

Ve – Volume de eluição.

Vo – Volume de vazio.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Família de inibidores de proteinases de plantas..... .21
TABELA 2 Substratos naturais e células alvo da ENH..... .25
TABELA 3 Especificidade do SKTI para enzimas proteolíticas diversas. 52
TABELA 4 Toxicidade aguda do SKTI sobre orgãos e populações celulares 64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Esquema de purificação do inibidor protéico de ENH. 40
FIGURA 2 Esquema dos ensaios biológicos com SKTI..... 45
FIGURA 3 Cromatografia de troca aniônica RESOURCE Q 48
FIGURA 4 Eletroforese em gel de poliacrilamida do SKTI..... 49
FIGURA 5 Determinação da massa molecular do SKTI por SDS-PAGE..... 50
FIGURA 6 Determinação da massa molecular por gel filtração Sephadex 75 50
FIGURA 7 IC_{50} do SKTI para elastase de neutrófilos humanos..... 51
FIGURA 8 Citotoxicidade e atividade hemolítica do SKTI sobre células do sangue periférico humano 53
FIGURA 9 Ensaio da inibição da liberação de ENH mediante estimulação por PAF E FMLP 53
FIGURA 10 Injúria pulmonar aguda induzida por LPS..... 55
FIGURA11 Efeito anti-hemorrágico do skti mediante estimulação por LPS 56
FIGURA 12 Atividade elastásica residual dos extratos pulmonares 57
FIGURA 13 Análises histopatológicas. 59

1 INTRODUÇÃO

1.1 INIBIDORES PROTÊICOS DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Inibidores de enzimas hidrolíticas são proteínas glicosiladas ou não (AZARKAN *ET AL*., 2006 ;CAVALCANTI *ET AL*., 2002), que ocorrem naturalmente em animais, microorganismos e plantas (BRZIN & KIDRIC, 1995 ;NEURATH, 1989; RYAN, 1990). Em vegetais superiores, os inibidores de proteinases foram isolados e purificados de diferentes espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Entre as monocotiledôneas, as investigações foram dirigidas particularmente para os vegetais da família das gramíneas, atualmente denominada família Poaceae, tendo como principais representantes, arroz, cevada, milho, trigo, centeio e sorgo. Entre as dicotiledôneas, a família das solanáceas, representada pelo tomate, batata e tabaco, e a família das leguminosas (ou família Fabaceae), representada pelos feijões, soja e ervilha, têm recebido especial atenção (BRZIN & KIDRIC, 1995; RICHARDSON, 1991; SCHULER *ET AL*., 1998).

Em diferentes tecidos e órgãos vegetais foram detectados, isolados e purificados inibidores de proteinases como em polpa de frutas (ARAÚJO *ET AL*., 2004), raízes, caules, folhas, frutos e, particularmente, em tubérculos e sementes (BRZIN & KIDRIC, 1995; GOMES *ET AL*., 2005a; GOMES *ET AL*., 2005b; OLIVEIRA *ET AL*., 2007, 2009). Estes últimos tecidos são ricas fontes de inibidores, correspondendo de 1 a 10% do total de proteínas (USSUF; LAXMI; MITRA, 2001). Os níveis desses inibidores nos vegetais são variáveis e dependem do estágio de maturação, da sua localização nos tecidos, do tempo de colheita e de armazenamento, como, também, da variedade da planta, podendo coexistir diferentes classes de inibidores em um único tecido ou órgão (BRZIN & KIDRIC, 1995; RYAN, 1990; RICHARDSON, 1991). Os inibidores de enzimas proteolíticas encontrados em sementes são importantes devido ao potencial efeito deletério na

nutrição animal e humana, bem como por seu papel de defesa em plantas contra microorganismos e insetos (Xavier-Filho, 1993).

1.2 INIBIDORES DE PROTEINASES - CLASSIFICAÇÃO

Inibidores de proteinases de plantas são primeiramente classificados de acordo com a classe mecanística das enzimas que eles inibem. Dessa forma, quatro classes de inibidores de proteinases foram estabelecidas: inibidores de proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas e de metalo-proteinases, sendo os inibidores de proteinases serínicas os mais estudados (RICHARDSON, 1991; RYAN, 1990). Muitos inibidores de proteinases cisteínicas também foram caracterizados (BODE & HUBER, 1992, 2000; MARGIS; REIS; VILLET, 1998; OLIVEIRA; XAVIER-FILHO, SALES, 2003), enquanto os inibidores de metalo-proteinases e de proteinases aspárticas são os estudados em menor escala. Estes inibidores são agrupados em famílias (Tabela 1), sendo a classe dos inibidores de proteinases serínicas composta por sete subfamílias e as demais compreendem apenas uma família (BODE, HUBER, 1992, 2000; KOIWA, BRESSAN, HESEGAVA, 1997; MARGIS; REIS; VILLET, 1998). Os inibidores de proteinases serínicas são agrupados com base na similaridade de seqüência primária, massa molecular, número de resíduos de cisteína e pontes dissulfeto (KOIWA, BRESSAN, HESEGAVA, 1997; RICHARDSON, 1991;).

TABELA 1. Família de inibidores de proteinases de plantas

Proteinases	Classes de inibidores	Famílias de inibidores
Serínicas	Inibidores de proteinases serínicas	Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Superfamília de Cereais Taumatina Ragi I-2/milho
Cisteínicas	Inibidores de proteinases cisteínicas	Fitocistatinas
Aspárticas	Inibidores de proteinases aspárticas	Inibidores de proteinases aspárticas
Metalo-proteinases	Inibidores de metalo-proteinases	Inibidores de carboxipeptidases A e B

FONTES: Ryan, 1990; Richardson, 1991

1.3 INIBIDORES DE PROTEINASES SERÍNICAS

Apesar da grande variedade de família de inibidores de proteinases serínicas, os mais estudados pertencem às famílias Kunitz e Bowman-Birk (ARAÚJO *ET AL*., 2004; RITONJA ET AL., 1990; BAUDYS *ET AL*., 1991; GOMES *ET AL*., 2005b; LAWRENCE, KOUNDAL, 2002; KOIWA, BRESSAN, HESEGAVA, 1997; USSUF; LAXMI; MITRA, 2001). Os estudos são principalmente, direcionados para aqueles encontrados em sementes das subfamílias das leguminosas (NORIOKA *ET AL*., 1988). Norioka e colaboradores (1988) sugeriram a existência de uma relação entre inibidores de proteinases serínicas de sementes de leguminosas e a evolução destas plantas. Nesse estudo, foi investigada a presença de inibidores de proteinases serínicas da família Bowman-Birk e Kunitz em sementes de 34 espécies de leguminosas. Em sementes das subfamílias de leguminosas mais primitivas (Caesalpinoideae e Mimosoideae), foram encontrados principalmente inibidores da família Kunitz, no entanto, na subfamília Papilionoideae que é mais recente evolutivamente, foram encontrados apenas inibidores da família Bowman-Birk.

Os inibidores de Kunitz são proteínas com massa molecular que variam de 18 a 26 kDa, distribuídos em, aproximadamente, 180 resíduos de aminoácidos, possuindo baixo conteúdo de resíduos de cisteína envolvidos em pontes dissulfeto (BATISTA ET AL., 1996 ;RICHARDSON, 1991) e, em geral, possuindo apenas um sítio reativo. Devido a este aspecto estrutural, eles são conhecidos como inibidores de uma cabeça ("*single headed*") (RICHARDSON, 1991). Entretanto, poucos representantes desta família foram caracterizados como inibidores que possuem dois sítios reativos. Dentre eles, o inibidor Kunitz purificado de soja (*Glycine. max*), denominado SKTI, apresentou forte atividade inibitória sobre a tripsina, mas também foi capaz de suprimir, fracamente, a atividade da quimotripsina, sugerindo a presença de dois sítios reativos na estrutura da proteína (BOSTERLING , QUAST, 1981).

Inibidores do tipo Kunitz podem ser constituídos por uma ou duas cadeias polipeptídicas. Os Inibidores encontrados nas subfamílias Caesalpinoideae e

Papilionoideae, geralmente, têm uma cadeia polipeptídica enquanto que aqueles da subfamília Mimosoideae são constituídos duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto, sendo caracterizados como proteínas diméricas (BATISTA *ET AL*., 1996 ;RICHARDSON, 1991). Inibidores com uma cadeia polipeptídica, possuindo cerca de 180 resíduos de aminoácidos, deram origem àqueles com duas cadeias polipeptídicas, após clivagem nos resíduos de aminoácidos da posição 140 ou em sua vizinhança, seguido de redução de pontes dissulfeto, originando, dessa forma, os inibidores com duas cadeias polipeptídicas (BATISTA *ET AL*., 1996; RICHARDSON, 1991).

A presença de carboidratos não é uma característica comum para inibidores da família Kunitz. Todavia, existem alguns relatos sobre este aspecto estrutural. Bhat e Pattabiraman (1989) purificaram uma glicoproteína de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*) de 26 kDa, apresentando inibição sobre a atividade catalítica da tripsina e quimotripsina. A presença de galactose, glicose, manose, frutose, xilose e glicosamina foram identificadas como sendo unidades de açúcares constituintes desse inibidor. Manose, xilose, fucose e outros açúcares foram detectados na estrutura do inibidor Kunitz purificado do látex de mamão (*Carica papaya*), denominado PPI (ODANI *ET AL*., 1996). Açúcares também foram detectados como um constituinte da estrutura de outros inibidores Kunitz, incluindo os inibidores purificados de sementes de pata de vaca (*Bauhinia rufa*) (SUMIKAWA *ET AL*., 2006) e de jacarandá branco (*Swartzia pickelli*) (CAVALCANTI *ET AL*., 2002). Entretanto, o papel destes carboidratos na estrutura de inibidores da família Kunitz ainda não foi esclarecido.

Os inibidores do tipo Kunitz podem ser agrupados de acordo com o tipo de proteinase que inibem: inibidores de tripsina, inibidores de quimotripsina, inibidores de elastase pancreática e, mais recentemente, inibidores de elastase de neutrófilos (SIEDLE *ET AL*., 2003). Apesar de detectada presença dos inibidores protéicos de elastase em extratos de mais de 30 espécimes vegetais (HOJIMA, PISANO, COCHRANE, 1983), a caracterização bioquímica destes inibidores ainda não foi bem realizada em comparação com os inibidores protéicos de tripsina,

restando apenas indícios sobre sua possível utilização como promissores agentes terapêuticos em diversas fisiopatologias de caráter inflamatório, coagulação e fibrinólise.

1.4 ELASTASE NEUTROFÍLICA HUMANA (ENH)

A elastase de neutrófilos humanos (ENH: EC 3.4.21.37) é uma proteinase serínica da família das quimotripsinas, que é armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos polimorfonucleares sendo o principal produto secretado quando estes se encontram ativados. É uma enzima fortemente básica e tem especificidade por aminoácidos hidrofóbicos (SIEDLE *ET AL*., 2003). Sua atividade, como em todas as proteinases serínicas, depende da tríade catalítica conservada, composta de aspartato, histidina e de serina (BODE, MEYER, POWERS, 1989). O gene da elastase é primariamente traduzido em uma pré-proteína de 267 resíduos aminoacídicos a qual sofre um processamento durante a fase de montagem nas extremidades N e C terminais.

A análise por SDS-PAGE da elastase purificada de neutrófilos revelou que a enzima apresenta três isoformas majoritárias com massas moleculares variando entre 29,3 kDa e 32 kDa que diferem em sua composição por diferentes padrões de glicosilação (TWUMASI, LIENER, 1977; WATOREK, HALBEEK, TRAVIS, 1994), mas tal característica parece não alterar sua especificidade para diferentes substratos e inibidores (GREEN *ET AL*., 1991).

O papel primordial da elastase em seu estado intracelular parece ser hidrolisar proteínas exógenas e microorganismos durante o processo de fagocitose dos neutrófilos. Entretanto, a nível extracelular (Tabela 2), ela apresenta uma propriedade peculiar de degradar componentes da matriz extracelular, como elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos e o colágeno (OWEN, 1995; SIEDLE *ET AL*., 2003). Outras funções também são atribuídas a essa protease, como a degradação de proteínas plasmáticas, propriedades bactericidas, degradação de mediadores de inflamação, receptores de membrana, surfactantes pulmonares, ativação de linfócitos e plaquetas, ativação de outras proteases, inativação de inibidores endógenos de proteinases, indução da

produção de citocinas e estimulação da secreção de muco pelo epitélio pulmonar (CARDEN *ET AL*., 1998; GINZEBERG *ET AL*., 2001; LIAU, CAMPBELL, 1995; SHAPIRO *ET AL*., 2003). Outra intrigante característica da elastase neutrofílica é sua capacidade, uma vez acoplada à membrana dos neutrófilos, de servir como um "path clearer" no processo de migração destas células pelos tecidos conectivos e no processo de diapedese dos leucócitos, uma vez que esta enzima irá agir sobre a liberação dos receptores CD11b/18 das moléculas de adesão vascular conhecida por ICAM (SHAPIRO, 2003).

TABELA 2. Substratos naturais e células alvo da elastase de neutrófilos

Classe	Proteínas/Células alvo	Função resultante
Proteínas da matriz	Elastina, colágeno (tipos I-IV), Proteoglicanos, Trombomodulina, Surfactantes pulmonares, Caderinas	Perda da função.
	Fibronectina, Laminina.	Quimiotaxia neutrofílica.
Proteínas plasmáticas	Fatores de coagulação (V, VIII, XI, XIII)	Perda da função.
	Fatores do complemento (C1s, C2-5, C9) Inativador C1	Ativação da cascata do complemento.
	Fibrinogênio, α2-plasmina	Quimiotaxia neutrofílica.
Imunoglobulinas	IgG, IgM	Ativação de neutrófilos e macrófagos.
Proteases	Quininogênio, Colagenase, Gelatinase	Ativação de enzimas.
Inibidores de proteases	TIMP	Perda da função.
Citocinas	IL-1, IL-2 e IL-6, TNFα	Perda da função.
Outros	Receptor plaquetário IIb/IIIa, ICAM-I	Perda da função.
	Linfócitos	Ativação.
	Plaquetas	Agregação.
	Células epiteliais	Liberação de IL-6, IL-8 e GM-CSF.
		Liberação de TGFβ e mucina.

Fonte: Kazuhito Kawabata, Tetsuya Hagio, Shozo Matsuoka, 2002.

1.5 PATOLOGIAS RELACIONADAS À DISFUNÇÃO DA ELASTASE DE NEUTRÓFILOS

A atividade proteolítica da elastase neutrofílica liberada para o meio extracelular é cuidadosamente regulada por inibidores macromoleculares endógenos, incluindo o α1-anti-tripsina (60 kDa) e α2-macroglobulina (725 kDa), e pelo inibidor de leucoproteinases de secreção SLPI (11 kDa) (KORKMAZ, MOREAU, GAUTIER., 2007; SULLIVAN *ET AL*., 2008; VIRCA ET AL., 1983,1984;). Entretanto, em alguns estados inflamatórios onde ocorre um grande influxo de leucócitos, sendo estes ativados por estímulos, tais como peptídeos N-formil bacterianos ou fMLP (N-formil-methionil-leucil-fenilalanina), PAF (Fator ativador de plaquetas), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e moléculas do sistema complemento, há uma exocitose anormal em grande quantidade das enzimas de grânulos como a elastase neutrofílica e, em menor escala, catepsina G, granzimas e proteinase 3. Além disso, ocorre uma explosão de compostos altamente oxidativos provocando um desequilíbrio elastase-inibidores endógenos nessas regiões levando a danos teciduais severos (GADEK, PATCH,1990; HIEMSTRA *ET AL*., 1993), e o desenvolvimento de doenças tais como: choque séptico, falência hepática, artrite reumatóide, psoríase, câncer de pele, arteriosclerose, glomerulonefrites, rejeição aguda de transplantes, pancreatite aguda, expansão e agravamento do processo de carcinogênese entre outras (DORING *ET AL*., 1994; JOHANSSON, 2002; SIEDLE *ET AL*., 2003; RAO, REDDY, COHEN, 1996). Nos pulmões este processo inflamatório exacerbado está envolvido em diversas doenças como: fibrose pulmonar e enfisema (SHAPIRO *ET AL*., 2003; ISHIZAWA *ET AL*., 2004), síndrome do desconforto respiratório agudo (CARNEY *ET AL*., 2001; GOSSAGE *ET AL*., 1993; MCGUIRE *ET AL*., 1982; NAKAYAMA *ET AL*., 2002), asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (HIROYKI, 2002), bronquite severa crônica (LAI *ET AL*., 2004; MOODLEY, KRISHNAN, LALLOO, 2000), fibrose cística (GREER *ET AL*., 2004; HANSEN,1995; MCGARVEY *ET AL*., 2002; O'CONNER *ET AL*., 1993), além de outras injúrias teciduais.

1.6 ENVOLVIMENTO DOS NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) são a classe predominante de leucócitos que se encontram em circulação no sangue, constituindo cerca de 50 a 70% da totalidade dos glóbulos brancos. Estas células são a primeira linha de defesa contra infecções bacterianas, fúngicas e virais, e sua capacidade de fagocitar e eliminar microorganismos invasores é vital para o sucesso da imunidade inata na defesa do indivíduo. Quando estimulados durante um processo infeccioso, os neutrófilos fagocitam os patógenos e os mantém alojados no interior de uma organela membranosa, denominada fagossomo, onde posteriormente, os microorganismos serão destruídos por um arsenal molecular composto de espécies reativas de oxigênio, de proteases e de peptídeos microbicidas, auxiliados por fatores como baixo pH e depleção de nutrientes no espaço intra-organela (REEVES, 2002; STUART; EZEKOWITZ, 2005).

Os neutrófilos apresentam diferentes tipos de grânulos citoplasmáticos que são classificados em azurófilos ou primários, específicos ou secundários, grânulo de gelatinases ou terciários e por fim, grânulos secretórios ou quaternários (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). As proteinases serínicas são produzidas quando o neutrófilo ainda se encontra no estágio de promielócito, fase esta em que os grânulos primários estão sendo formados (TAKAHASHI *ET AL*., 1988). As proteinases serínicas são sintetizadas na forma de zimogênios que necessitam de duas modificações proteolíticas na porção N-terminal para se tornarem ativas. Após a remoção do peptídeo sinal, a pró-enzima é, em seguida, processada pela protease catepsina C, durante seu trajeto em direção ao grânulo azurófilo, onde são armazenadas na forma de enzimas ativas (ADKISON *ET AL*., 2002).

Após a sua maturação na medula óssea vermelha, os neutrófilos são liberados para a circulação, onde terão uma vida média curta em torno de 48 h (HIEMSTRA, 1993). O recrutamento de neutrófilos para os sítios de inflamação se dá através de três etapas bem conhecidas e que caracterizam o fenômeno da diapedese: rolamento, adesão e transmigração através do endotélio. O rolamento dos neutrófilos circulantes sob a parede do endotélio caracteriza o evento inicial

do recrutamento celular para os sítios de inflamação. Nesta etapa, ocorrem diversas ligações reversíveis com glicoproteínas adesivas denominadas selectinas. Elas estão presentes tanto nas superfícies leucocitárias quanto no interior dos vasos sanguíneos (BEVILACQUA; NELSON, 1993; LASKY, 1992). Existem três tipos de selectinas, a selectina L (leucócitos), a selectina P (plaquetas) e a selectina E (endotélio). Todas compartilham de um domínio do tipo lectina na sua extremidade C-terminal o que permite a elas interagirem com carboidratos específicos, principalmente oligossacarídeos similares a sialo-mucina (VARKI, 1997).

O processo de adesão ocorre após o rolamento dos neutrófilos. Sob condições normais, a força de ligação com as selectinas, durante o rolamento, não é forte o suficiente para induzir uma aderência forte, mas, após a estimulação dos PMNs ocorre um aumento na afinidade destas ligações. Isto acontece devido a interação de quimiocinas com os receptores neutrofílicos, levando a fosforilação da selectina L, culminando com o aumento de sua afinidade pelo seu ligante (HARIBABU *ET AL*., 1997). O envolvimento das selectinas dos neutrófilos e a presença de moléculas pró-inflamatórias resultarão no aumento da expressão e da capacidade de ligação de moléculas denominadas integrinas, essenciais para o processo de adesão dos neutrófilos ao endotélio (GOPALAN *ET AL*., 1997; SIMON *ET. AL*., 1999). As integrinas são um grupo de glicoproteínas transmembrana e heterodiméricas encontradas em neutrófilos e em outras células agindo como mediadoras nos processos de adesão célula-célula e célula-matriz (VAN DER FLIER; SONNENBERG, 2001). Devido a esta forte capacidade de ligação, elas desempenham um papel fundamental nos processos inflamatórios, garantindo o sucesso do neutrófilo na migração trans-endotelial. A transmigração endotelial é uma etapa que ocorre após o rolamento e a adesão neutrofílica (SPRINGER, 1994). O fenômeno da transmigração pode se dar via três rotas, a paracelular, migração entre junções endoteliais, ou pela via transcelular a qual os PMNs passam para a matriz extracelular através do citoplasma.

Os neutrófilos são direcionados a locais específicos através de um gradiente químico constituído por algumas substâncias que se acumulam nos

sítios inflamatórios. Estas substâncias são denominadas fatores quimiotáticos. Todos os granulócitos, monócitos e, em menor extensão, linfócitos, respondem aos estímulos quimiotáticos com diferentes taxas de velocidade. Tanto substâncias exógenas como endógenas podem agir como quimiotáticos. Os agentes exógenos mais comuns são os produtos bacterianos como lipopolissacarídeos e alguns peptídeos que possuem o aminoácido N-formil-metionina terminal. Os agentes endógenos incluem componentes do sistema complemento, especialmente C5a, produtos da via da lipoxigenase, especialmente leucotrieno B_4 (LTB_4), produtos do metabolismo fosfolipídico como fator ativador de plaquetas (PAF) e citocinas, em particular as que pertencem à família das quimiocinas como as interleucinas 1 e 8 (BARRINGTON ET AL, 2001; JOHNSTON; BUTCHER, 2002). Tais agentes quimiotáticos se unem a receptores específicos ligados à proteína G. Os sinais iniciados por estes receptores resultam no recrutamento de mais proteínas G e na ativação de outras moléculas efetoras como fosfolipase C, fosfoinositol-3 cinase, assim como no recrutamento de proteína tirosina cinase. Tais mensageiros atuam no fosfatidil inositol da membrana celular a fim de gerar mensageiros lipídicos secundários que aumentam as concentrações citoplasmáticas de cálcio ativando GTPases da família Rac/Rho/cdc42, assim como várias cinases. As GTPases induzem a polimerização da actina no pólo estimulado da célula fazendo com que os leucócitos se movam, estendendo pseudópodes que puxam a parte anterior na direção da extensão (RICKERT *ET AL*, 2000; STOSSEL, 1999).

Após sua estimulação, ativação e locomoção, os neutrófilos finalmente chegam ao foco da inflamação, onde irá ocorrer a liberação de enzimas dos grânulos e a fagocitose, que resultará na eliminação de agentes nocivos e infecciosos; um dos maiores benefícios do acúmulo leucocitário neste local. Uma vez exterminado o agente causador da estimulação dos neutrófilos, eles poderão entrar na fase de apoptose, onde os corpos apoptóticos remanescentes serão fagocitados pelo sistema mononuclear fagocitário, o que garante que os produtos tóxicos dos grânulos neutrofílicos não sejam liberados na matriz extracelular (HIEMSTRA,1993).

Após o processo fagocitário, o ciclo da resposta inflamatória chega ao seu fim, em parte devido à meia-vida curta ou a rápida degradação enzimática dos mediadores da inflamação (principalmente pelas enzimas elastase, trombina e plasmina), produção de citocinas antiinflamatórias como TGF-β (secretado por macrófagos e outras células), inibição da liberação de TNF-α à nível de macrófagos, mudança nos derivados da lipoxigenase, de leucotrienos para lipoxinas, e pela ação de inibidores de enzimas que degradam a matriz extracelular, principalmente elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase 3 (CHRISTINE *ET AL*., 2007; NATHAN, 2002). Até que um novo estágio inflamatório seja desencadeado o sistema imune e os tecidos normalmente irão permanecer em um equilíbrio fisiopatológico oscilante, que só será rompido mediante nova estimulação inflamatória como infecções (bacterianas, virais ou parasitárias), toxinas microbianas, traumas, queimaduras, congelamento, radiações, necrose tissular, corpos estranhos (farpas e suturas), reações de hipersensibilidade, etc (WEISMAN, 1992).

Em algumas situações, os neutrófilos podem ocasionar lesões tissulares relacionado ao seu mau funcionamento, tanto por falhas relacionadas à fagocitose, excesso de infiltrado leucocitário devido à estimulação exacerbada pelos mediadores da inflamação, quanto por defeitos de caráter genético (JAESCHKE; SMITH, 1997). Todos estes fatores irão recorrer para a insurgência de doenças inflamatórias relacionadas à proteólise exacerbada pela elastase de neutrófilos, como descrito anteriormente (JOHANSSON, 2002; RAO, REDDY, COHEN, 1996).

1.7 INJÚRIA PULMONAR

A injúria pulmonar caracteriza-se por intensa permeabilidade vascular com rápida formação de edema, grande influxo de leucócitos, substituição do tecido pulmonar por tecido fibroso, eventos hemorrágicos e perda da estrutura natural dos alvéolos pulmonares comprometendo a complacência do órgão (WIENER-KRONISH, GROPPER, MATTHAY, 1990). No pulmão, encontra-se um ambiente ideal para eventos contínuos de destruição e remodelamento tecidual envolvendo a elastase

neutrofílica, tanto devido à matriz rica em elastina, colágeno, proteoglicanos e surfactantes, substratos altamente suscetíveis a ação desta enzima, assim como pelo fato do tecido pulmonar ser uma fonte constante de contato com agentes microbianos e toxinas do ambiente, que servem de estímulo e atrativos para as células leucocitárias podendo desencadear eventos inflamatórios de diversas gravidades. Os neutrófilos, em particular, são as primeiras células recrutadas em resposta a estímulos infecciosos e inflamatórios atuando como a primeira linha de defesa imune inata do organismo, tendo como atividades microbicidas seqüestro intracelular de microorganismos dentro dos fagossomos, fusão dos grânulos neutrofílicos com os fagolisossomos, liberação de proteinases e peptídeos anti-microbianos e uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio geradas através da ativação do sistema NADPH oxidase associado à membrana celular (NATHAN, 2006), culminando com a destruição do patógeno. Entretanto, o sistema de defesa descrito, em particular as proteinases serínicas neutrofílicas, também estão envolvidas em vários processos inflamatórios não infecciosos. A elastase representa uma importante enzima envolvida em diversos processos de injúria pulmonar incluindo enfisema (SNIDER, 1989), injúria pulmonar aguda (LEE; DOWNEY, 2001) e diversas doenças inflamatórias crônicas envolvendo as vias aéreas (FISCHER; VOYNOW, 2002). Nestes eventos de injúria a elastase tem recebido uma atenção especial, por ser uma enzima capaz de degradar praticamente todas as proteínas da matriz extracelular pulmonar, assim como uma grande quantidade de proteínas plasmáticas (HAVEMANN; GRAMSE, 1984). Outra agravante do prolongamento do processo inflamatório desencadeado pela atividade proteolítica descontrolada da elastase neutrofílica consiste na capacidade desta enzima induzir a liberação de citocinas pro-inflamatórias como a interleucina 6 (BEDARD *ET AL*., 1994) e a interleucina 8 (NAKAMURA *ET AL*., 1992). Outro aspecto interessante a ser considerado, são os produtos da atividade proteolítica desta enzima sobre a matriz extracelular como a fibrina (CEPINSKAS, NOSEWORTHY, KVIETYS, 1997) e a laminina (STEADMAN *ET AL*., 1993), que atuam como agentes quimiotáticos para neutrófilos. Estudos anteriores também comprovaram a interação da ENH com a integrina CR3 (CAI; WRIGHT, 1996),

promovendo uma maior migração dos neutrófilos dos sítios de adesão endoteliais para o tecido pulmonar.

Os fluidos broncoalveolares apresentam uma elevada concentração de inibidores endógenos de elastase para garantir um perfeito equilíbrio neste duplo papel destruição e reparo tecidual. Há algum tempo atrás não se sabia como este perfeito sistema de equilíbrio protease/antiprotease conseguia ser burlado gerando as injúrias pulmonares e, consequentemente, as doenças relacionadas à proteólise exacerbada atribuída a esta enzima. Estudos realizados por Lee *et al.*, (1981) amostras do lavado broncoalveolar de pacientes acometidos de edema pulmonar, síndrome do desconforto respiratório agudo, enfisema e fibrose pulmonar revelaram uma elevada atividade elastásica, dando espaço para novas hipóteses e possíveis mecanismos moleculares que explicassem a ineficiência deste equilíbrio fisiológico atribuído aos inibidores endógenos.

Ohlsson e Olsson (1974) mostraram que havia diversos mecanismos pelos quais a ENH escapava por diversos meios da regulação pelos inibidores endógenos. Primeiro, os principais inibidores endógenos α1-antitripsina e α2-macroglobulina apresentam elevado peso molecular, não conseguindo penetrar nos microambientes entre os neutrófilos e seus substratos teciduais devido à limitações estéricas, não neutralizando a ação desta proteinase por completo. Outro aspecto interessante demonstrado foi que mesmo havendo inibição da elastase pela α2-macroglobulina, isso não era suficiente para inativar completamente esta enzima, que ainda, permanece capaz de clivar pequenos substratos (STONE *ET AL.*, 1982). Tal fato também é considerado um agravante em injúrias pulmonares como o enfisema e até na artrite reumatóide (MOORE *ET AL.*, 1999). O segundo mecanismo de escape se dar pelo fato de o principal inibidor α1-antitripsina é rapidamente inativado através de processos oxidativos no seu motivo de ligação a elastase (resíduo de metionina na posição 358) devido as espécies reativas de oxigênio derivadas dos neutrófilos ativados (MATHESON *ET AL.*, 1979). Estudos posteriores também mostraram que os inibidores α2-macroglobulina e SLPI também sofriam inativação por um mecanismo semelhante (WEISS, 1989; KRAMPS, VAN TWISK, DIJKMAN, 1987). O terceiro mecanismo de escape se dá pela incapacidade de inibição da elastase

neutrófilica associada à membrana dos neutrófilos ativados ou ligada a substratos, sendo estes, capazes apenas, de inibir a elastase livre nos fluidos pulmonares (KAWABATA, MOORE, WILLOUGHBY, 1996; OWEN, 1995). Tais mecanismos descritos foram de importante esclarecimento para o entendimento das doenças pulmonares relacionadas, reforçando a hipótese da superprodução de elastase neutrofílica em detrimento de sua efetiva inibição (CAMPBELL *ET AL*., 1999). Estas evidências foram de fundamental importância para a busca de inibidores de proteases naturais de fácil obtenção e administração, através de aerossóis ou injeções subcutâneas, com pequeno tamanho, específicos para ENH, provenientes de fontes seguras, livre de impedimentos estéricos e resistentes à oxidação e oscilações de pH e temperatura nos microambientes de injúria pulmonar (EDWARDS; BERNESTEIN, 1994; FOOK *ET AL*., 2005; GONZÁLEZ *ET AL*., 2006; HOJIMA, PISANO, COCHRANE, 1983; LARINOVA *ET AL*., 1996; WILLIAM; NORTON, 1999).

1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, a busca por alimentos funcionais de origem vegetal, tem aumentado consideravelmente em todo o mundo. A soja (*Glicine max*), uma leguminosa da subfamília Papilionoidae, tem sido um dos principais alimentos incluídos na dieta humana em muitos países, devido aos seus efeitos benéficos na saúde humana além de suas inúmeras aplicações na indústria de combustíveis e extração de óleos. A soja consiste em uma excelente fonte de proteínas de apreciável valor nutricional, aliada a suas propriedades terapêuticas na prevenção de doenças cardiovasculares (ANDERSON; MAJOR, 2002), auxílio no controle da glicemia (HOLT, MUNTYAN, LIKYER, 1996), prevenção da osteoporose e sintomas da menopausa (SETCHELL; CASSIDY, 1999), diminuição nos índices de câncer de cólon, mama e próstata (MESSINA, 1994), além de suas atividades anti-inflamatórias (SCHEPPACH, LUETHRS, MELCHER, 2004).

Os inibidores de proteases da soja têm atraído a atenção de pesquisadores em todo o mundo devido à suas inúmeras aplicações biomédicas. Foi observado que extratos protéicos da soja apresentavam forte atividade inibitória para tripsina,

quimotripsina e enzimas da secreção neutrofílica, como catepsina G e elastase neutrofílica (LARIONOVA *ET AL.*, 1993), mostrando a presença de inibidores protéicos em sua semente. Recentemente o inibidor Bowman-Birk (LARIONOVA *ET AL.* 1997) e SKTI foram indicados como alvos promissores para o desenvolvimento de terapias contra diversas patologias em que a elastase neutrofílica apresenta papel preponderante no seu desenvolvimento. Sendo assim, a soja, por apresentar uma rica fonte de inibidores naturais para elastase, aliada a seus compostos funcionais e sua forte aceitação mundial, é dentre as muitas sementes de leguminosas, ainda uma das mais promissoras para estudos farmacológicos.

Atualmente a indústria farmacêutica demonstra um forte interesse nos inibidores protéicos naturais que inibam diretamente a elastase neutrofílica ou interfiram em suas vias de liberação (fMLPR, PAFR) e que sejam mais eficazes e específicos que os tratamentos vigentes. Por isso, a constante busca por inibidores extraídos de fontes seguras, que possibilitem uma produção em larga escala, seja através da síntese de recombinantes dos motivos de ligação previamente conhecidos nos inibidores, como os das famílias Kunitz, Bowman-Birk e Kazal, para o emprego no desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios, em novas terapias preventivas ou paliativas mais eficazes no tratamento de indivíduos geneticamente deficientes em α1anti-tripsina, acometidos de fibrose cística e nas mais diversas doenças relacionadas à injúrias pulmonares.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial farmacológico do SKTI como agente terapêutico em modelos animais de injúria pulmonar aguda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar o SKTI a partir de uma fração comercial enriquecida com este inibidor.
- Realizar sua caracterização bioquímica quanto à sua especificidade para a elastase de neutrófilos humanos, através da IC_{50} e também para outras proteinases serínicas e cisteínicas;
- Avaliar seu potencial citotóxico para celulares sanguíneas humanas através do método de citometria de fluxo;
- Avaliar a inibição da liberação da elastase de neutrófilos humanos, *in vitro*, mediante estimulação por N-formil-methionil-leucil-phenilalanina (fMLP) e fator ativador de plaquetas (PAF).
- Determinar o potencial anti-inflamatório do SKTI no modelo de injúria pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos em camundongos.
- Avaliar o possível efeito tóxico do inibidor de tripsina tipo Kunitz da soja, à nível sistêmico e sanguíneo, após administração por via subcutânea de doses elevadas deste inibidor.

3 **MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 MATERIAL

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Alíquotas de sangue humano foram obtidas de indivíduos adultos saudáveis da cidade de Natal, RN. Camundongos swiss machos (6 semanas) foram obtidos do Biotério Central da UFC (Fortaleza, Brasil), com acesso a água e alimentos *ad libitum*.Todos os experimentos envolvendo animais estão de acordo com as normas do comitê de ética para pesquisa com animais do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte sob número de aprovação 082/07.

3.1.2 - **Reagentes**

- Fração de SKTI tipo II (Sigma-Co.);
- Papaína (Sigma-Co);
- Quimotripsina (Sigma-Co);
- Tripsina (Sigma-Co);
- Elastase de leucocitos humanos(Sigma-Co);
- Elastase pancreática bovina (Sigma- Co);
- Calicreína pancreática bovina (Sigma-Co);
- Calicreína plasmática (Sigma-Co);
- Bromelaína (Sigma-Co);
- Citocalasina B (Sigma-Co);
- Azocaseína 1% (Sigma-Co);
- Bapna (*N*-α-benzoil-arginina-p-nitroanilida / Sigma-Co);
- SAAVNA (*N*-succinil-L-alanil-L-valina-*p*-nitroanilide (Sigma-Co);
- LPS (Lipopolissacarídeos de *E. coli* / Sigma-Co)
- PAF (fator de ativação plaquetária /Sigma-Co);
- fMLP (*N*-formil-methionil-leucil-phenilalanina/Sigma-Co);

- Dimetilformamida (Sigma-Co);
- Albumina sérica bovina - BSA (Sigma-Co);
- DMSO (dimetilsulfóxido/BDH GPR);
- SDS (dodecil sulfato de sódio - Reagen);
- Acrilamida e *N'N'*-metilenobisacrilamida (Sigma-Co);
- TEMED – *N, N, N',N'*-tetrametiletilinodiamino – (Sigma-Co);

- Padrões de massa moleculares para eletroforese (Fermantas life sciences);
- Coomassie Blue G-250 e R-250 (Sigma-Co);
- Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3.1.3 **Equipamentos**

- Sistema de cromatografia líquida AKTA purifier (GE);
- Espectrofotômetro U-2000 (HITACHI);
- Banho-Maria Te 056 (Tecnal);
- Balança analítica eletrônica AS 210 (SCIENTECH);
- Micro centrífuga 5410 (Eppendorf);
- Centrífuga CR 21 (HITACHI);
- Bomba Pump-1 (Amersham Biosciences)

- Coletor de frações REDIFRAC modelo 2112 da LKB (Bromma, Suécia).
- Citômetro de fluxo Sysmex XT-1800i (Sysmex Lab).
- Microscópio biológico molecular E-100 (Nikon)
- Liofilizador L108 (Tecnal)
- Purificador de água Milli-Q® Water System da Millipore Corp. (Bedford,MA, USA);

3.2 MÉTODOS.

3.2.1 **Preparo da fração rica em SKTI**.

A fração comercial, rica em SKTI foi pesada, solubilizada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, na proporção de 1:1 mg/mL, centrifugada a 14.000 g e o sobrenadante reservado para os posteriores passos de purificação no sistema de cromatografia líquida AKTA purifier utilizando a coluna cromatográfica de troca aniônica Resource Q 1mL.

3.2.2 **Determinação da concentração de proteínas.**

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Medidas de densidade óptica a 280 nm foram mensuradas para acompanhamento de cromatografias.

3.2.3 **Purificação do inibidor de elastase de neutrófilo.**

Cromatografia de Troca aniônica em Resource Q 1mL:

A preparação obtida a partir da fração comercial de SKTI foi submetida a uma cromatografia de troca aniônica em coluna de Resource Q (1 mL). A coluna foi equilibrada com o tampão utilizado na dissolução da amostra. A eluição do material retido foi realizada com o mesmo tampão acrescido de NaCl em um gradiente linear de (0-1 M), sob o fluxo de 2 mL por minuto durante 40 minutos. Ensaios de inibição para tripsina e elastase de neutrófilos foram realizados e o pico contendo atividade inibitória para ENH foi reunido, concentrado e aplicado em uma cromatografia de desalinização Hitrap Desalting (5 mL). O material livre de NaCl foi submetido à liofilização e utilizado nos ensaios posteriores (Fig.01).

3.2.4 **Preparo das soluções usadas como substrato nos ensaios de atividade enzimática**

a) Azocaseína a 1%:

A solução foi preparada pesando-se um grama desta substância que foi suspensa em 100 mL de tampão PBS 0,1 M pH 7,4. A suspensão foi fervida por 15 minutos e após resfriamento o pH foi ajustado. O volume foi completado com água destilada para 100 mL. A solução foi reservada em congelador até a sua utilização.

b) SAAVpNA 150 mM:

Para o preparo deste substrato 7,2 mg de SAAVpNA foram pesados e dissolvidos em 100 µL de DMSO P.A.

c) BApNA 1,25 mM:

BApNA a 1,25 mM foi dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido 1% do volume final) e o volume completado com tampão PBS 0,1 M, pH 7,4.

3.2.5 **Determinação da atividade anti-elastásica neutrofílica**

Para determinação da atividade anti-elastásica de neutrófilos, 10 µL da elastase leucocitária obtida comercialmente foi pré-incubada com 450 µL de tampão PBS 0,1 M pH 7,4 e 50 µL das frações protéicas de SKTI por 15 min. A reação foi iniciada após adição de 5 µL de SAAVNA 150 mM. O tempo de reação do ensaio foi de 1 hora, a temperatura de 37^0C. A reação foi interrompida com a adição de 250 µL de solução de ácido cítrico 2,0 %. Os produtos de reação foram lidos a 405 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata incluíndo provas em branco.

Fig. 01. Esquema de purificação e caracterização do inibidor de tripsina de soja (SKTI).

3.2.6 **Caracterização do inibidor de ENH purificado**

a) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises eletroforéticas da fração rica em SKTI e da fração purificada de SKTI foram realizadas segundo o método desenvolvido por Laemmli (1970). Foram utilizadas placas de vidro de dimensões 10x14 cm, espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 12 % contendo:

0,372 mL de água destilada, 1,25 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 50 μL de SDS 10%, 3,3 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (30:2), 25 μL de persulfato de amônio (10%) e 3,0 μL de temed concentrado. O gel de concentração foi preparado com 1,5 ml de água destilada, 0,625 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8, 25 μL de SDS 10 %, 0,33 ml de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (30:2), 12,5 μL de persulfato de amônio (10%) e 2,5 μL de temed concentrado. Tampão de amostra constituído de Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, sacarose 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol foi adicionado às frações protéicas. O tampão de corrida continha trizma base 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 10 %. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 30 mA por aproximadamente 1 hora. Após o marcador de corrida (azul de bromofenol) atingir o final do gel, a eletroforese foi encerrada. Após a eletroforese os géis foram corados segundo procedimento descrito por Weber & Osborne (1969). A solução corante foi preparada usando-se Coomassie Blue R-250 a 1 %, metanol 40 %, ácido acético 10 % em água. O descoramento foi feito com uma solução contendo ácido acético 10 % e etanol 30 %.

b) Especificidade SKTI para enzimas de diversas fontes (XAVIER; CAMPOS,1984):

b.1 Ensaio de inibição para papaína :

Para determinação da atividade anti-papainásica, 15 μL da solução de papaína (1,0 mg/ mL tampão PBS 0,1 M, pH 7,4) foram pré-incubadas com 40 μL de solução ativadora contendo L-cisteína 0,05 M e EDTA 0,02 M pH 8,0, 40 μL de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4 por um período de 10 minutos a 37 ^{0}C. Após este período, foi acrescentado, 50 μL do SKTI e 345 μL do mesmo tampão utilizado anteriormente. Passados mais 15 minutos, a reação foi iniciada acrescentando-se 200 μL de solução de azocaseína 1 %. Após 10 minutos, a reação foi interrompida com 300 μL de TCA 20%, seguidos de centrifugação a 13000 x g e o sobrenadante alcalinizado com 400 μl NaOH 2 N. O ensaio controle foi realizado na ausência do inibidor, nas mesmas condições acima descritas. Os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo provas em branco.. A absorbância foi medida a 440 nm.

b.2 Ensaio de inibição para bromelaína:

Para determinação da atividade inibitória para a bromelaína, 20 μL de solução da enzima (1 mg/ml de tampão acetato de sódio, pH 5,6) foram pré - incubadas com 40 μL de solução ativadora contendo L-cisteína 0,05 M e EDTA 0,02 M e 40 μL de tampão acetato de sódio, pH 5,6 por um período de 10 minutos a 37 ^{0}C. Após este período, foram acrescentados 50 μL do SKTI e 335 μL do mesmo tampão utilizado anteriormente. Passados mais 15 minutos, a reação foi iniciada acrescentando-se 200 μL de solução de azocaseína 1 %. A reação foi paralisada com 300 μL de TCA 20%, após 10 minutos de reação, seguida de alcalinização com 400 μL NaOH 2 N. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração inibidora, nas mesmas condições acima descritas. Os ensaios foram realizados em triplicata,incluindo provas em branco.

b.3 Ensaio de inibição para tripsina:

Para determinação da atividade inibitória contra a tripsina, 10 μL de solução de tripsina (0,1 mg/ml de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4) foram pré-incubadas com 460 μL de tampão PBS 0,1M, pH 7,4, 120 μL de HCl 2,5 mM e 50 μl do SKTI por um período de 10 minutos a 37 ^{0}C. Após esse período, a reação foi iniciada acrescentando-se 500 μL de solução de BApNA 1,25 mM nos tubos teste. A reação foi paralisada com 120 μL de ácido acético 30%, após 15 minutos de reação. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração inibidora, nas mesmas condições acima descritas. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco incluídas. Absorbância foi medida a 440 nm.

b.4 Ensaio de inibição da quimotripsina:

Para determinação da atividade inibitória contra a quimotripsina, 40 μL de solução de quimotripsina (0,1 mg/mL de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4) foram pré-incubadas com 410 μL de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4 e 50 μL do SKTI por um período de 15 minutos a 37 ^{0}C. Após este período, a reação foi iniciada acrescentando-se 200 μL de solução de azocaseína 1 %. A reação foi paralisada com 150 μL de TCA 20 % após 30 minutos e alcalinizada com 400 μL de NaOH 2 N. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração

inibidora, nas mesmas condições acima descritas. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco incluídas. Absorbância foi medida a 440 nm.

b.5 Ensaio de inibição para elastase pancreática:

Para determinação da atividade inibitória para a elastase pancreática, 40 µL de solução de elastase (0,1 mg/mL de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4) foram pré-incubadas com 410 µL de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4 e 50 µL do SKTI por um período de 15 minutos a 37 ^{0}C. Após este período, a reação foi iniciada acrescentando-se 200 µL de solução de azocaseína 1 %. A reação foi interrompida com 150 µL de TCA 20 % após 30 e alcalinizada com 400 µL de NaOH 2 N. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração inibidora, nas mesmas condições acima descritas. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram incluídas. Absorbância foi medida a 440 nm.

b.6 Ensaio de inibição para calicreína pancreática:

Para determinação da atividade inibitória para a calicreína pancreática, 20 µL de solução (0,5 mg/mL de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4) foram pré-incubadas com 410 µL de tampão PBS 0,1 M pH 7,4 e 50 µL do SKTI por um período de 30 minutos a 37 ^{0}C. Após esse período, a reação foi iniciada acrescentando-se 200µL de solução de azocaseína 1%. A reação foi interrompida com 150 µL de TCA 20 % após 30 minutos e alcalinizada com 400 µL de NaOH 2 N. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração inibidora, nas mesmas condições acima descritas. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram incluídas. Absorbância foi medida a 440 nm.

c) Determinação da IC_{50} do SKTI:

Para determinação da IC_{50} do inibidor de elastase dos neutrófilos humanos foi construída uma curva de inibição, para a qual foram utilizados concentrações crescentes do inibidor (1, 3, 6, 12 e 25 µg/mL de ensaio) nos ensaios, descritos no item 3.2.6.b .Todos os ensaios foram feitos em triplicata e provas em branco foram incluídas. O valor da IC_{50} foi utilizado como padrão para os demais ensaios *in vitro*.

3.2.7 **Ensaio de citotoxicidade e atividade hemolítica para SKTI**

Os efeitos do SKTI sobre a viabilidade celular foram avaliados sobre células do sangue periférico de humanos. Cerca de 1 mL de sangue total foi incubado com SKTI por 15 minutos a 37ºC para avaliar possíveis alterações hematológicas. A viabilidade das células foi analisada por citometria de fluxo (Sysmex XT-1800i).

3.2.8 **Efeito sobre a liberação de ENH por PAF e fMLP**.

O ensaio de liberação de elastase de neutrófilos foi feito segundo o método descrito por Johansson et al. (2002), no qual foram utilizados 25 µL de suspensão de leucócitos (5 x 10^6 cel/mL) e a esta adicionados: 470 µL de PBS 0,1 M, pH 7,4; 2,5 µL de citocalasina B 0,965 mg/mL e 5 µL de SAAVpNA 150 mM nos tubos teste. Esta solução foi homogeneizada cuidadosamente e mantida por 5 minutos a 37°C. Após este período, 100 µL dos indutores PAF (50 µM em DMSO 20%) ou fMLP (50 µM em etanol) foram acrescentados. Depois de 10 minutos a reação foi interrompida com 250 µL de ácido cítrico 2%. Em seguida, o SAAVpNA foi acrescentado aos tubos brancos. Os tubos foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos e lidos em 405 nm. Tubos teste com PAF ou fMLP, bem como seus brancos, foram feitos em paralelo. Para o ensaio de inibição foi seguido o procedimento acima descrito, porém 50 µL de SKTI e 393 µL de PBS 0,1 M pH 7,4 com 2,5% de BSA foram inicialmente adicionados aos 25 µL de suspensão de leucócitos.

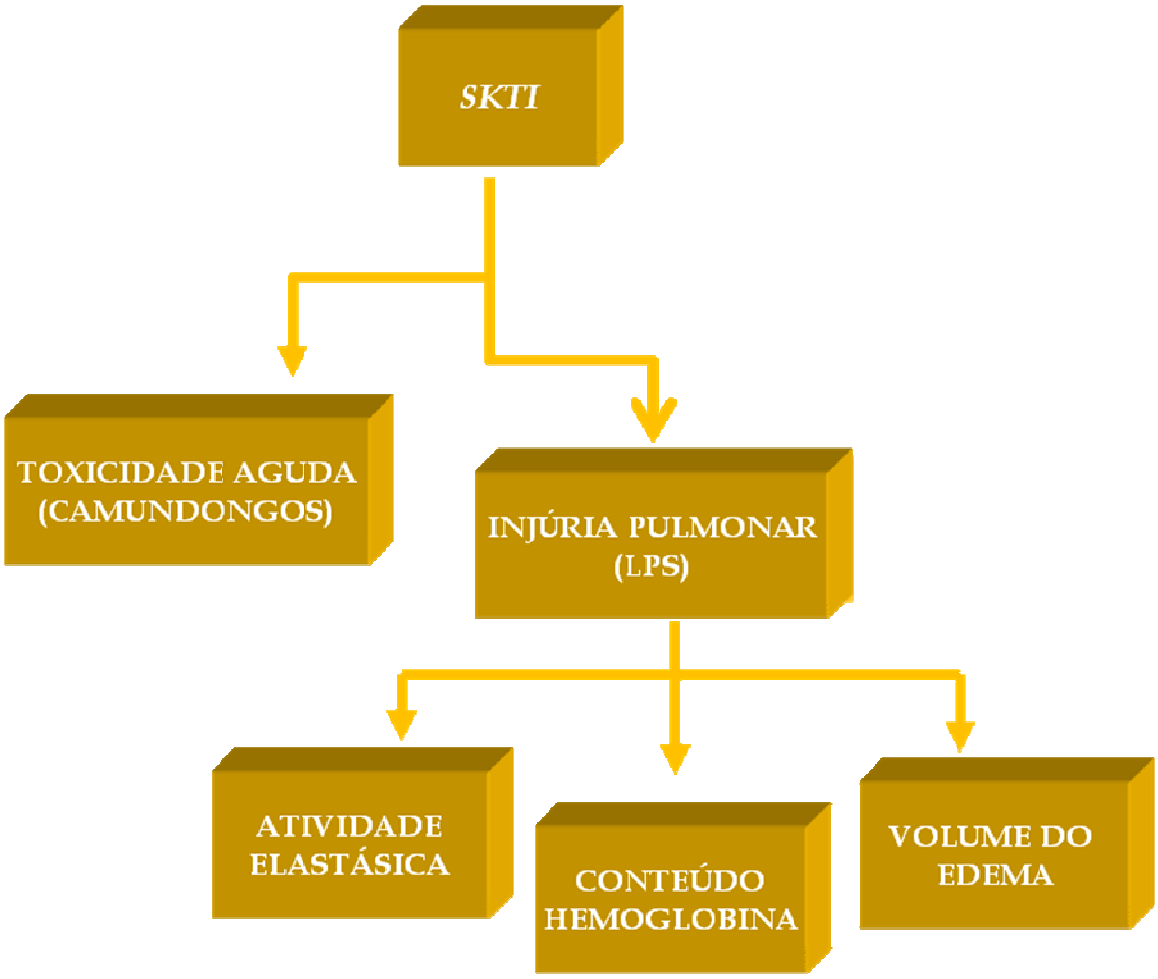

Fig. 2 Esquema dos ensaios biológicos com o inibidor protéico SKTI.

3.2.9 **Injúria pulmonar aguda em camundongos induzida por LPS**

A habilidade do SKTI na prevenção da injúria pulmonar aguda induzida por LPS foi avaliada utilizando camundongos swiss machos (6 semanas; n= 11 por grupo). Os camundongos foram anestesiados por inalação de halotano e, em seguida, 100 μL de solução salina 0,9 % NaCl (controles) ou SKTI (50 and 100 μg/kg) em salina foram injetados intraperitonialmente. Após 30 minutos da injeção do inibidor, 50 μL de solução salina com LPS de *E. coli* (10 mg/Kg) foram administradas por injeção intrapulmonar. Para o grupo controle negativo foram administrado apenas 50 μL do veículo. Após 4h, os animais foram mortos por asfixia em atmosfera de CO_2, os pulmões excisados, pesados (obtenção do peso úmido), rapidamente congelados à -80° C e, posteriormente,

liofilizados. Após a liofilização, os pulmões foram novamente pesados para a obtenção do peso seco, visando avaliar a massa do conteúdo de água ou à razão peso úmido/peso seco correspondente ao edema (M.E.= P.U.- P.S.). Os pulmões foram macerados e extraídos na proporção 1:10 (m/v) em tampão PBS 0,1 M pH 7.4, centrifugados à 3000 x g por 15 minutos a 4° C e o sobrenadante utilizado nos experimentos subseqüentes. Para as análises histológicas pulmões úmidos recém excisados foram escolhidos de forma randômica (n=3 por grupo) e preparados cortes histológicos subsequentemente corados através do processo de hematoxilina e eosina.

3.2.10 **Hemorragia pulmonar em camundongos induzida por LPS**

A capacidade do SKTI em proteger os animais dos efeitos hemorrágicos pulmonares provenientes da indução por LPS foi avaliada por espectrofotometria. Cada pulmão foi macerado individualmente e dissolvido na proporção 1:10 (m/v) em tampão PBS 0,1 M (pH 7.4). Alíquotas previamente obtidas dos sobrenadantes pulmonares foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 minutos a 4℃, e, em seguida, 50 µL deste sobrenadante foram homogeneizados com 950 µL de solução salina. O conteúdo de hemoglobina nas amostras foi determinado de forma espectrofotométrica a 541 nm e expressa em unidades óticas.

3.2.11 **Medição da atividade elastásica dos extratos pulmonares**

A atividade elastásica dos extratos pulmonares foi avaliada usando SAAVpNA como substrato. Alíquotas de 50 µL de sobrenadante dos extratos pulmonares previamente obtidas foram incubadas com 450 µL de tampão PBS por 30 minutos a 37℃. As reações foram iniciadas com a adição de 5 µl de uma solução de SAAVpNA 150 mM. Após 60 minutos a 37℃ a reação foi paralisada com a adição de 250 µL de ácido cítrico a 2%. As amostras foram centrifugadas e a absorbância dos sobrenadantes foi aferida a 405 nm. Os resultados foram expressos em unidades de atividade enzimática (1 U.A. representa o aumento de uma unidade de absorbância a 405 nm em um período de 60 minutos). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.12 **Ensaio de toxicidade aguda sistêmica**

Para analisar os efeitos do inibidor administrado em elevadas concentrações, camundongos Swiss machos, com aproximadamente 6 semanas (n=10 por grupo), foram injetados por via subcutânea com 100 µl de solução salina estéril (grupo controle) ou com o mesmo volume de SKTI nas concentrações de 100 µg/kg e 1000 µg/kg, em intervalos de 24 horas, durante 7 dias seguidos, para observação de possíveis efeitos tóxicos nos órgãos (aspectos macroscópicos e massa), contagem total e diferencial das populações celulares sanguíneas e níveis séricos de transaminases hepáticas. No oitavo dia, os camundongos foram mortos por asfixia em atmosfera de CO_2. O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos de hemólise contendo EDTA. As populações celulares sanguíneas (eritrócitos, plaquetas e leucócitos) foram estimadas por contagem em câmara de Neubauer. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada através de microscopia óptica, após análise de lâminas de esfregaço sanguíneo utilizando panótico como coloração, com aumento de 100X. Amostras sanguíneas também foram submetidas à ensaios enzimáticos para alanina amino transferase (AST) e aspartato amino tranferase (ALT) (Labtest diagnostic kit transaminases). Os órgãos incluindo coração, pulmões, baço, fígado e rins foram excisados, pesados e comparados com o grupo controle (salina).

3.2.12 **Análises estatísticas**

As diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando análise de variância (ANOVA) para amostras repetidas e, em seguida, o teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. Os níveis de significância foram determinados com o programa GraphPad InStat.

4 **RESULTADOS**

4.1. PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS *IN VITRO*

4.1.1 **Cromatografia de troca aniônica em RESOURCE Q**.

A fração de soja foi dissolvida em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 na concentração de 1 mg/Ml, e submetida à cromatografia de troca aniônica em Resource Q. O material não retido foi eluído com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e o retido eluído com um gradiente linear de 0-1 M NaCl no mesmo tampão de eluição (Fig.3). Todos os picos protéicos retidos na coluna apresentaram inibição para tripsina, mas apenas o pico majoritário foi capaz de inibir ambas as enzimas, tripsina e ENH em 100% e 85%, respectivamente. As frações inibitórias para elastase foram coletadas, concentradas e aplicadas na coluna Hitrap Desalting, sendo posteriormente liofilizadas para os demais ensaios.

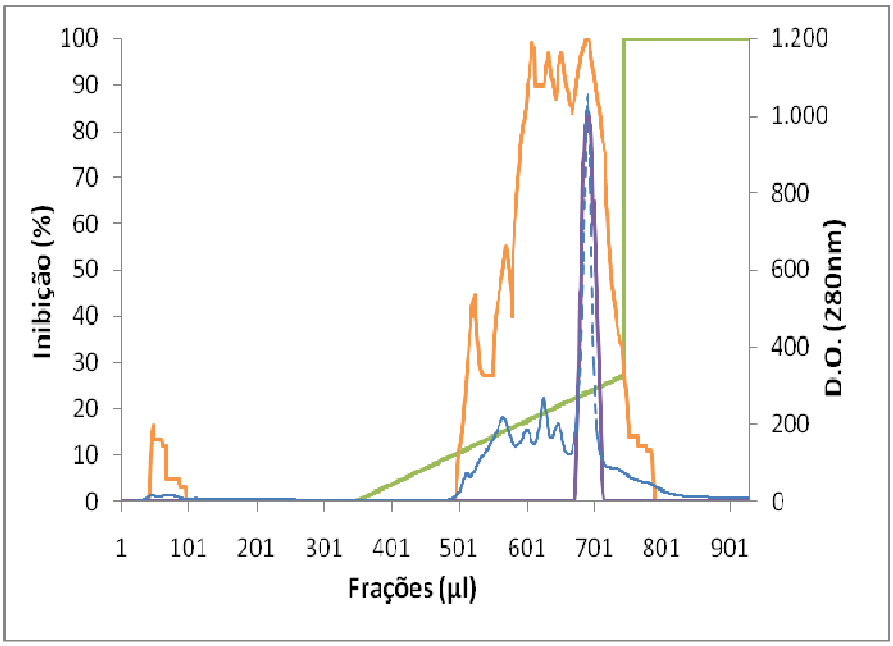

Fig. 3. Perfil de eluição e inibição da fração comercial de SKTI após cromatografia de troca aniônica em Resource Q (1mL) usando gradiente salino de 0-1 M NaCl. Absorbânica 280 nm em azul, inibição para tripsina em laranja e inibição para elastase de neutrófilos em lilás. Linha verde gradiente linear salino.

4.1.2 **Eletroforese em gel de poliacrilamida do SKTI**

Amostras de 15 μg do inibidor purificado foram submetidas à SDS-PAGE a 12 %, apresentando um perfil eletroforético no qual foi observado uma única banda protéica de aproximadamente 20 kDa tanto em redutoras (β-mercaptoetanol) como em não redutoras (Figura 4).

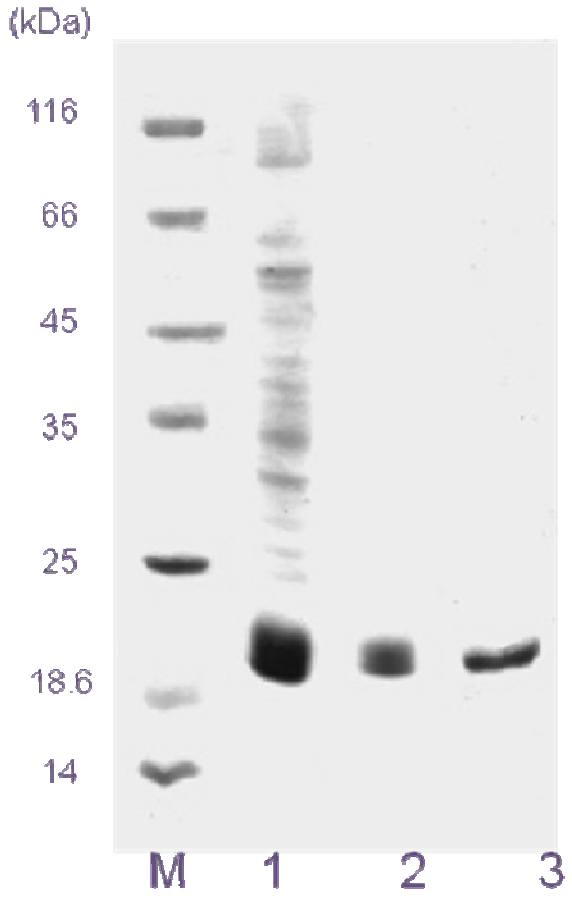

Fig. 4. Eletroforese das etapas de purificação do SKTI (SDS-PAGE 12%) corado com comassie blue R-250; (M) Marcadores de massa molecular: β-galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase (25 kDa), β-lactoglobulina (18,6 kDa) e lisozima (14 kDa); (1) Fração rica em SKTI; (2) SKTI Resource Q; (3) SKTI Resource Q em condições redutoras.

4.1.3 **Determinação da massa molecular por SDS-PAGE**

A massa molecular do SKTI foi determinada, analisando a sua mobilidade eletroforética em relação a massa dos marcadores (Figura 5), correspondendo a 19,7 kDa.

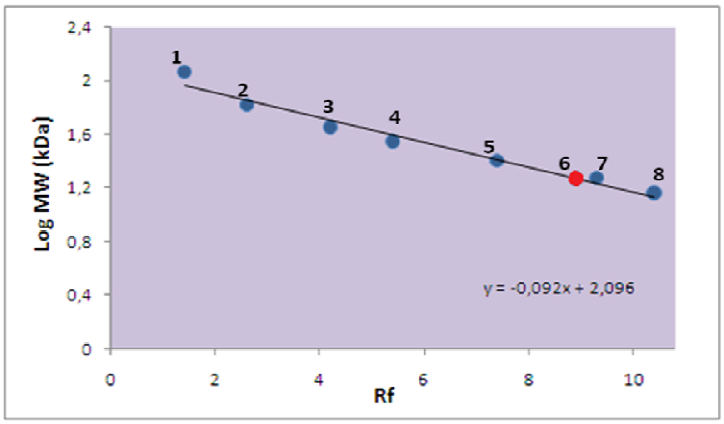

Fig. 5. Determinação da massa molecular de SKTI através da curva de calibração dos padrões moleculares de proteínas, determinada por SDS-PAGE. 1- 116 kDa; 2- 66 kDa; 3- 45 kDa; 4- 35 kDa; 5- 25 kDa; 6- 18,9 kDa (SKTI em vermelho); 7- 18,6 kDa; 8- 14,4 kDa,da esquerda para direita.

4.1.4 **Determinação da massa molecular por filtração em gel Shepadex 75 10 300 GL (AKTA purifier).**

A massa molecular do SKTI foi também estimada, por filtração em gel, e corresponde a 19,5 kDa de acordo com a curva de calibração (Figura 6).

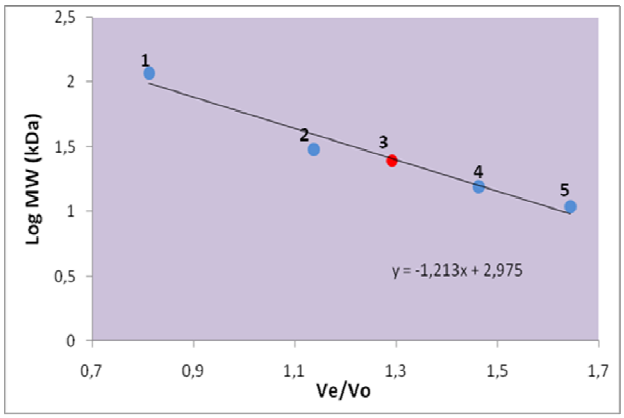

Fig. 6. Determinação da massa molecular de SKTI através da curva de calibração com marcadores de massa molecular obtidos por filtração em Gel Sephadex 75 10 300 GL: 1- Conalbumina 75 kDa; 2- Ovalbumina 44 kDa; 3- SKTI 19,5 kDa (em vermelho); 4- Citocromo C 13 kDa; 5- Aprotinina 6,5 kDa, da esquerda para a direita.

4.1.5 **Determinação da IC_{50} do SKTI para elastase de neutrófilos humanos**

Para determinação da IC_{50} do inibidor de elastase dos neutrófilos humanos foi construída uma curva de inibição onde foram utilizadas concentrações crescentes do inibidor (1, 3, 6, 12 e 25 µg/ml de ensaio). Na figura 7 observa-se que a concentração de inibidor que diminui a atividade da enzima em 50% (IC_{50}) foi de 8 µg (0,3 nM). Esta concentração foi utilizada como padrão para os demais ensaios *in vitro*.

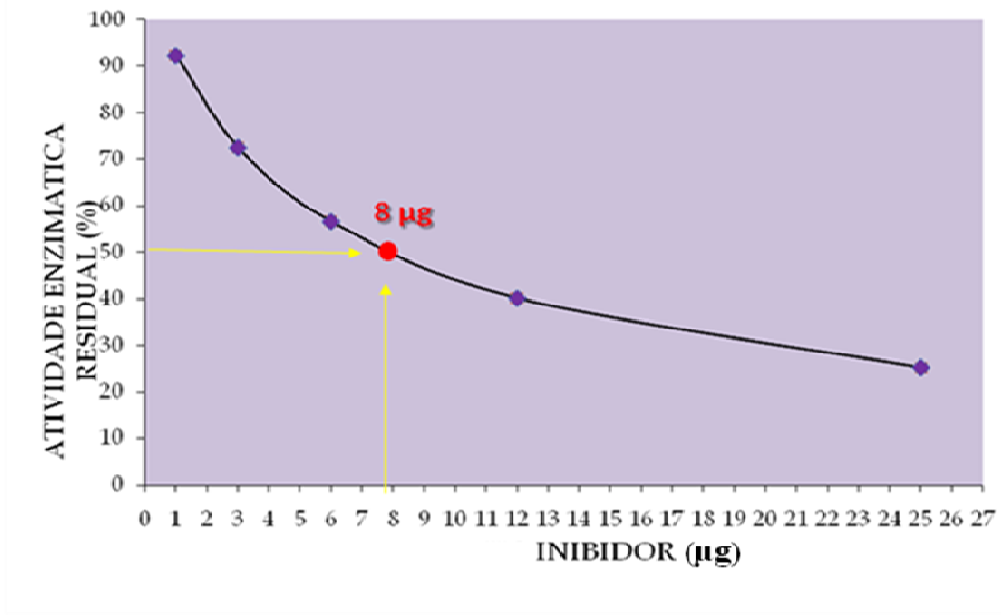

Fig. 7. Curva de inibição da ENH com concentrações crescentes de SKTI. A IC_{50} corresponde à concentração de inibidor que diminui a atividade da elastase em 50%.

4.1.6 **Especificidade do SKTI para enzimas proteolíticas**

A partir da concentração correspondente à IC_{50},determinado para ENH, ensaios de inibição para algumas enzimas proteolíticas serínicas e cisteínicas foram realizados e apresentaram um percentual de inibição de 98 % para tripsina, 37,8 % para quimotripsina e 16 % para elastase pancreática. O SKTI não apresentou inibição para as proteinases cisteínicas

papaína e bromelaína nem para calicreína pancreática e plasmática. (Tabela 3).

TABELA 3 - Inibição para enzimas proteolíticas serínicas e cisteínicas

ENZIMAS	PERCENTUAL DE INIBIÇÃO (%) 8 µg.mL^{-1} (0.3 nM) de SKTI
ELASTASE NEUTROFÍLICA	**49.48 ± 0.33**
TRIPSINA	**98 ± 0.11**
QUIMOTRIPSINA	**37.8 ± 2.56**
ELASTASE PANCREÁTICA	**16 ± 1.87**
CALICREÍNA PANCREÁTICA	*ND
CALICREÍNA PLASMÁTICA	*ND
PAPAÍNA	*ND
BROMELAÍNA	*ND

*A concentração de 0.3 nM foi usada como padrão. N.D. (não detectada).

4.1.7 **Citotoxicidade e atividade hemolítica do SKTI sobre células do sangue periférico humano.**

As células do sangue periférico humano não sofreram ação citotóxica e as hemácias não foram hemolisadas como visto por citometria de fluxo, quando na ausência e presença do SKTI (figura 8A e 8B respectivamente).

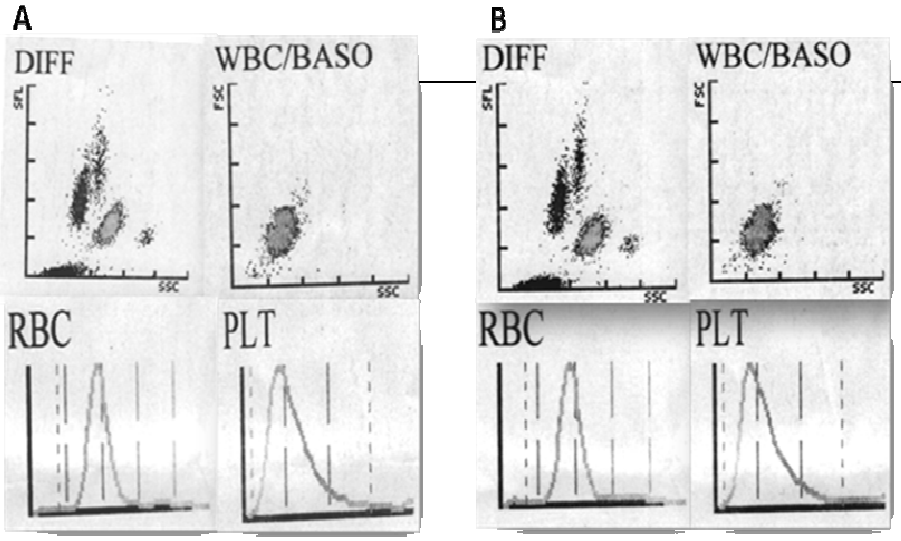

Fig. 8. Análise do efeito citotóxico e hemolítico de SKTI sobre sangue periférico total: (A) sem SKTI e (B) com SKTI. DIFF, contagem diferencial de leucócitos; WBC/BASO, contagem de basófilos; RBC e PLT, contagem de eritrócitos e plaquetas, respectivamente.

4.1.8 **Ensaio da inibição da liberação de ENH mediante estimulação por PAF e fMLP**.

Na figura 9 observa-se a inibição da liberação da elastase dos neutrófilos humanos que foram isolados de sangue humano fresco. PAF e fMLP foram utilizados para iniciar a exocitose da elastase *in vitro*. O resultado revelou que o SKTI foi capaz de inibir fortemente ambas as vias de liberação de ENH estimuladas no ensaio. Os valores de inibição foram de 83.1% e 70%, comparados com os controles positivos PAF e fMLP, respectivamente.

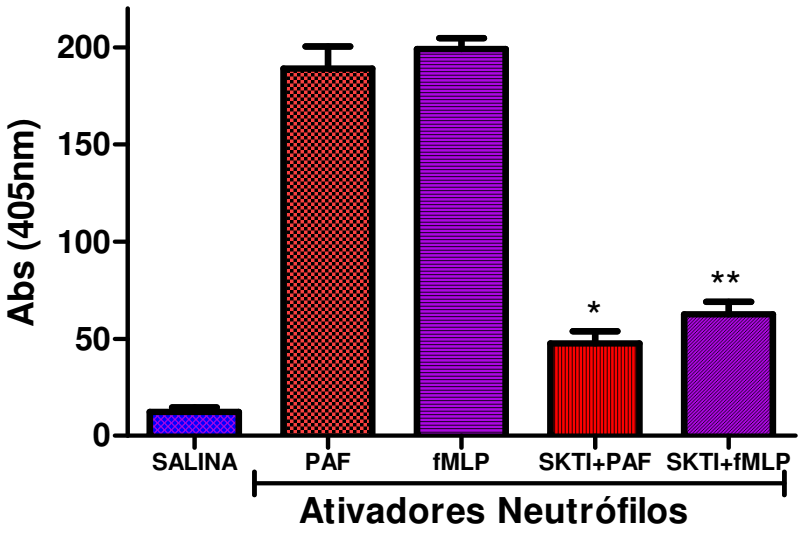

Fig. 9. Ensaio de inibição da liberação de ENH mediante estimulação por fMLP e PAF.

4.2 **ENSAIOS BIOLÓGICOS**

4.2.1 **Injúria pulmonar aguda em camundongos induzida por LPS**

A habilidade do SKTI na diminuição dos eventos hemorrágicos foi avaliada através do ensaio de injúria pulmonar aguda em camundongos induzida por LPS. Injeções (50 μL) intrapulmonares de LPS (10 mg/kg) foi capaz de induzir um aumento significativo na massa úmida pulmonar (184 ± 8,7 mg) quando comparadas com a do grupo que recebeu apenas salina (152 ± 5,0 mg). Tratamentos com SKTI nas doses de 50 e 100 µg/kg resultaram em um decréscimo na massa úmida dos pulmões (166 ± 4,1 mg e 153 ± 2,9 mg respectivamente). Todos os tratamentos com SKTI foram significativos para $P<0,01$ quando comparados com o controle positivo, de maneira dose dependente (Figura 10A). Os pulmões liofilizados de todos os grupos foram pesados individualmente e tiveram suas massas subtraídas da massa úmida para a obtenção da massa do conteúdo de água referente ao edema produzido devido à injúria por LPS. Os valores de massa de água obtidos para os tratamentos com SKTI nas concentrações de 50 e 100 µg/kg de SKTI foram de 31,65 ± 2,7 mg e 25,33 ± 2,2 mg, respectivamente. A massa do conteúdo de água do grupo salina foi de 24,75 ± 1,6 mg e do grupo que recebeu somente LPS de 41,06 ± 3,6 mg. Essa diminuição na massa do edema foi significante para $P<0,01$, quando comparado com os grupo controle (Figura 10B).

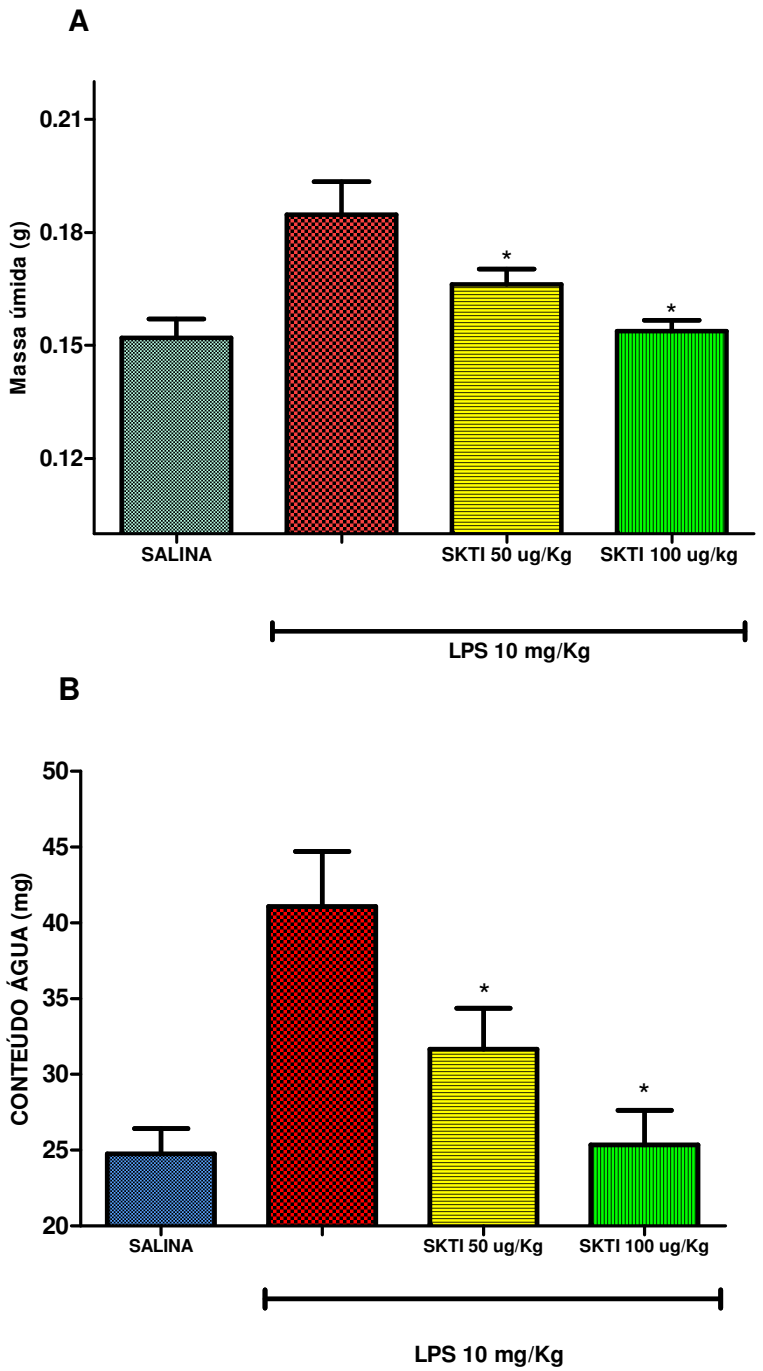

Fig.10 Injúria pulmonar aguda induzida por LPS. (A) Massa úmida dos pulmões. (B) A massa do conteúdo de água, determinada depois de subtraído da massa úmida. Valores são médias com desvio padrão para 10 animais(* P< 0,01 vs. LPS).

4.2.2 **Avaliação da hemorragia pulmonar induzida por LPS em camundongos tratados com SKTI**

O emprego do SKTI na diminuição do efeito hemorrágico ocasionado pela elastase de neutrófilo após a indução por LPS foi analisado. O grupo LPS apresentou níveis elevados de hemoglobina nas amostras aferidas a 541 nm (3159 ± 251 unidades) em relação ao grupo onde foi administrado apenas salina (1545 ± 193 unidades). Os tratamentos com SKTI nas concentrações de 50 e 100 µg/kg reduziram significativamente as unidades de absorbância referentes à hemoglobina. As unidades de absorbância foram de 2106 ± 868 e 1860 ± 286 respectivamente (Figura 11). Esses valores foram significantes para P <0,05 quando comparados com o grupo controle. Não houve diferença estatística para P<0,05 entre as concentrações testadas.

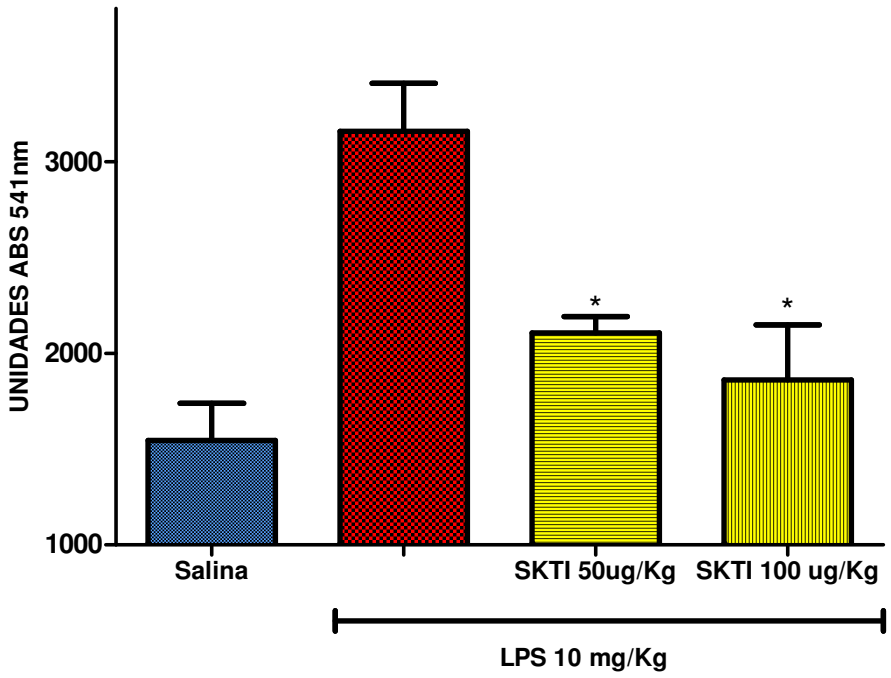

Fig.12. Efeito anti-hemorrágico do SKTI mediante atividade da ENH induzida por LPS. Os valores são representados em unidades óticas de absorbância à 541nm. Os valores são representados como médias e seus respectivos desvios padrões (n=10 por grupo).

4.2.3 ATIVIDADE ELASTÁSICA RESIDUAL DOS EXTRATOS PULMONARES

Os níveis de atividade elastásica dos homogenatos dos tecidos pulmonares submetidos ao estímulo por LPS foram medidos. A atividade do grupo LPS sem tratamento (controle positivo) foi de 115 U.A. ± 17,5, enquanto o do grupo salina (controle negativo) foi de 47 U.A. ± 9,9. Os valores obtidos para os grupos tratados com SKTI nas concentrações de 50 e 100 µg/kg foram de 72 U.A. ± 15,2 e 52 U.A. ± 7,3, respectivamente. Apenas o tratamento com 100 ug/kg de SKTI apresentou significância para P <0,05 quando comparado com o controle positivo (Figura 12).

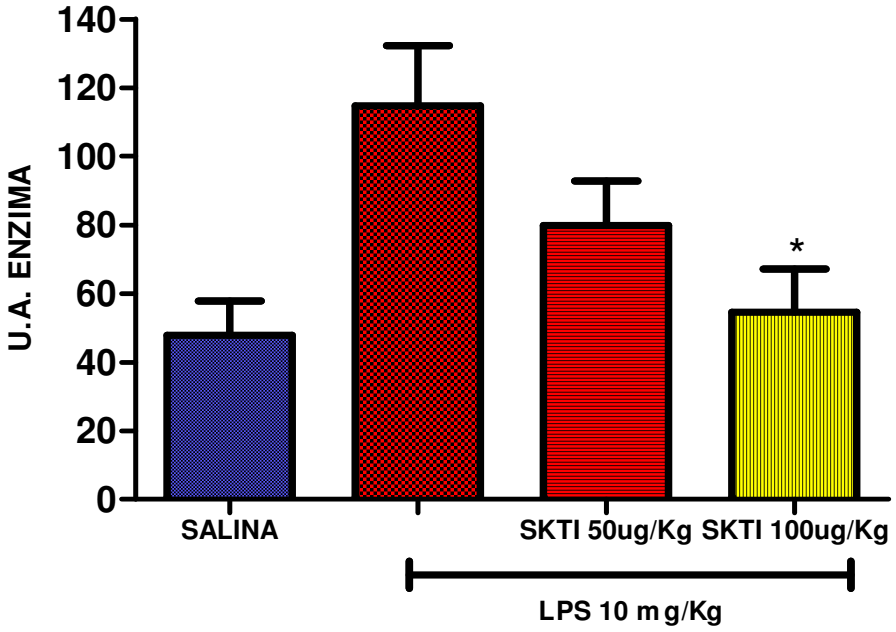

Fig.12. Efeito do tratamento com diferentes concentrações de SKTI sobre a atividade elastásica dos extratos de pulmões estimulados por LPS. SAAVpNA foi utilizado como substrato colorimétrico. Os resultados foram expressos em unidades de atividade enzimática. Os valores são médias de grupos com seis animais com seus respectivos desvio padrão.

4.2.4 **Análises histopatológicas**

Lâminas de tecido pulmonar inflamado foram realizadas e submetidas a análises histopatológicas (figura 13). Secções dos pulmões submetidos a estímulo por LPS (controle positivo) e dos pertencentes ao grupo no qual foi

administrado apenas salina (controle negativo) foram coradas e analisadas por microscopia óptica (Fig. 13A e 13B). A mesma indução da injúria por LPS foi realizada nos grupos que receberam SKTI nas concentrações de 50 e 100 μg/kg (Fig.13C e 13D). A análise cuidadosa dos pulmões induzidos por LPS revelou áreas alveolares não uniformes, que apresentavam infiltração de células leucocitárias e uma morfologia severamente alterada, demonstrando danos consideráveis ao tecido pulmonar. Em aumento de 100 vezes (detalhes de imagens no canto inferior esquerdo da figura 13), também foi possível observar com mais clareza uma formação de exsudato com muitos infiltrados de neutrófilos. As paredes alveolares circundantes dos alvéolos estavam dilatadas (perda da complacência) e com a presença de eritrócitos. Os tratamentos com as concentrações de SKTI (50 e 100 μg/kg) mostraram uma proteção/diminuição efetiva, de forma dose dependente. Tratamentos com SKTI reduziram significativamente o influxo de células inflamatórias e dano tecidual, formação excessiva de exsudato, assim como eventos hemorrágicos ocasionados pela atividade proteolítica da elastase aumentando a preservação da forma dos alvéolos.

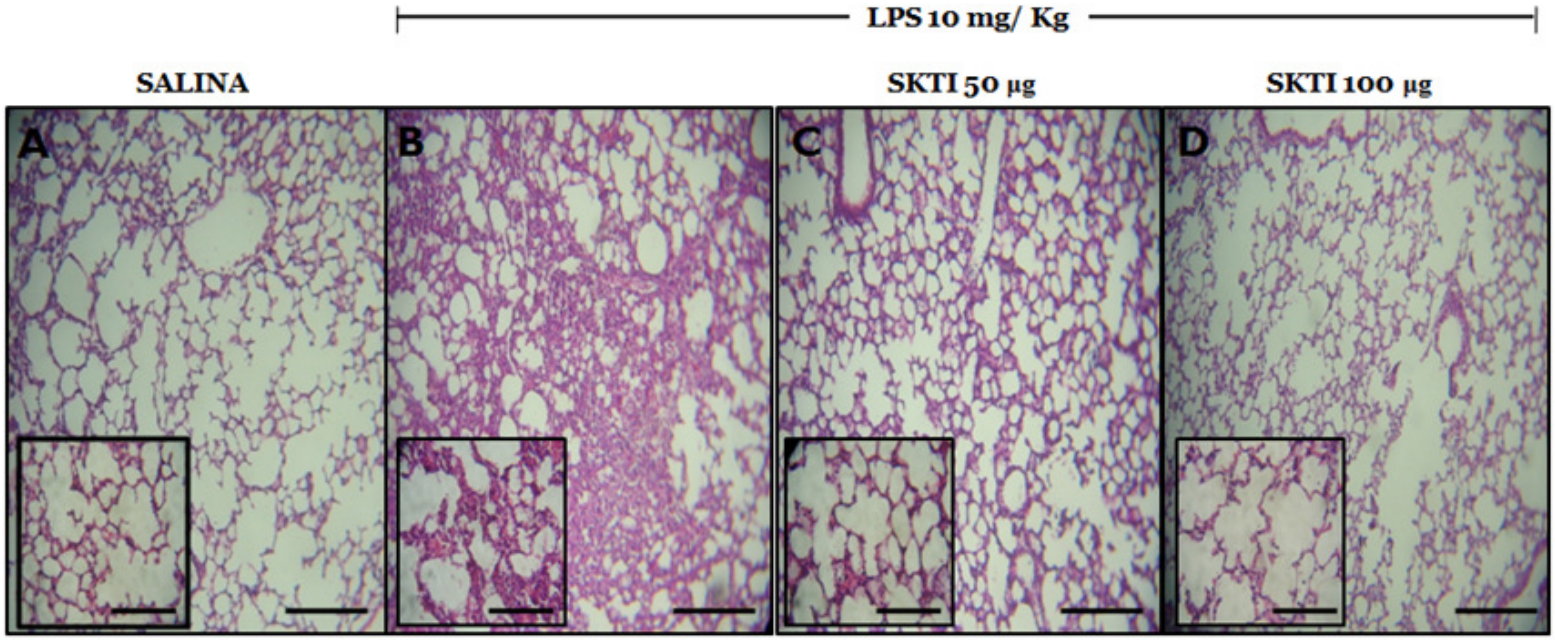

Fig.13 Análises histopatológicas de tecidos pulmonares referentes ao ensaio de injúria pulmonar aguda induzida por LPS e coradas com H&E. (A) Salina (B) LPS 10 mg/kg (C) SKTI 50 µg/kg (D) SKTI 100 µg/kg (Caixas maiores: A barra de 1 mm represeta 100 µm em um aumento de 10 x; Imagens reduzidas: A barra de 1 mm representa 25 µm em um aumento de 40 x)

4.2.5 **Ensaio de toxicidade aguda sistêmica em camundongos**

Os grupos tratados com SKTI nas concentrações de 100 μg/kg e 1000 μg/kg não demonstraram diferenças significativas quanto à massa dos órgãos, contagem de eritrócitos, plaquetas, leucócitos e transaminases para P <0,01, quando comparados com o grupo controle (salina) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise da possível toxicidade aguda do SKTI sobre orgãos e populações celulares.

ANÁLISES	SALINA	SKTI 100 µg/Kg	SKTI 1000 ug/Kg
Massa dos orgãos (g)			
CORAÇÃO	0,126 ± 0,076	0,121 ± 0,007	0,123 ± 0,008
PULMÕES	0,173 ± 0,019	0,167 ± 0,019	0,169 ± 0,018
FÍGADO	1382 ± 0,085	143 ± 0,162	138 ± 0,092
BAÇO	0,129 ± 0,019	0,148 ± 0,03	0,152 ± 0,008
RINS	0,378 ± 0,032	0,405 ± 0,078	0,374 ± 0,032
Contagem geral sanguínea			
PLAQUETAS	1.350,000 ± 242,712	1.437.714 ± 368,702	1.218,857 ± 334,972
ERITRÓCITOS	8.563,143 ± 809,425	7.804,286 ± 836238	7.557,143 ± 467,465
LEUCÓCITOS	7.264 ± 485	7.492 ± 280	5.928 ± 996
Contagem diferencial de leucócitos			
NEUTRÓFILOS	12 ± 5,9	13,2 ± 4,7	14,8 ± 4,5
LINFÓCITOS	81 ± 6,5	78 ± 4,7	75,8 ± 3,3
MONÓCITOS	5 ± 1,7	7,5 ± 2,7	7,5 ± 3,3
EOSINÓFILOS	1,5 ± 0,5	1,16 ± 0.4	1,7 ± 1,1
BASÓFILOS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Transaminases hepáticas (U.A)			
ALT	32,8 ± 1,17	35,25 ± 2,31	34,4 ± 0,68
AST	39,1 ± 2,74	42 ± 4,24	38,41 ± 3,91

*Nível de significância p < 0,01

5 DISCUSSÃO

Vários estudos foram executados utilizando plantas como fonte de inibidores de proteinases, especialmente em sementes de leguminosas (BATISTA *ET AL*., 1996; MACEDO *ET AL*., 2000a; MACEDO *ET AL*., 2000b; PAIVA *ET AL*., 2006; RICHARDSON, 1991; TRONCOSO, ZOLEZZI, HELLMAN, 2003). Estas sementes possuem inibidores de proteinases serínicas que pertencem às famílias de inibidores de Kunitz, Bowman-Birk, Batata I e II, entre outros (Richardson, 1991). Inibidores de Kunitz e de Bowman-Birk estão envolvidos em muitos processos fisiológicos e, por isso, são os mais estudados como candidatos para possíveis drogas. Extratos protéicos de várias leguminosas, como feijão lima (*Phaseolus limensis*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão adzuki (*Phaseolus angularis*), lentilha (*Lens culinares*), ervilha (*Pisum sativum*) e, mais recentemente o tamarindo (*Tamarindus indica*) apresentaram-se como ricas fontes de inibidores de ENH (FOOK *ET AL*. 2005; HOJIMA, PISANO, COCHRANE, 1983; SIEDLE *ET AL*., 2003). Estes inibidores de elastase pertencem à família de inibidores de Kunitz e/ou à família de Bowman-Birk. Os inibidores do tipo Bowman-Birk parecem ter uma característica intrínseca de inibir a ENH assim como quimotripsina, mas devido a suas recentes e promissoras propriedades anti-carcinogênicas, estudos relacionados a esta propriedade ainda não se encontra como foco principal de suas aplicações (KENNEDY, 1998; RUI-FENG, SONG, CHI, 2005). A sua aplicação na terapêutica das doenças antiinflamatórias tem perdido a cena para inibidores do tipo Kunitz, serpinas e Kazal, o que tem tornado a busca por inibidores exógenos, não só de ENH, mas também de outras enzimas relacionadas com o processo inflamatório, com o intuito de minimizar tais moléstias relacionadas à destruição tecidual por proteases.

A ENH é uma proteinase serínica que tem a capacidade de degradar elastina, fibronectina, proteoglicanos e proteínas do plasma. Ela é também um modulador das funções inflamatórias de células, tais como a ativação de linfócitos e agregação de plaquetas (OWEN, 1997). Quando a liberação de elastase é intensa, este fato resulta num desequilíbrio entre a quantidade de elastase e seu inibidor endógeno, o $\alpha_1$anti-tripsina (SIEDLE *ET AL*., 2003). A acumulação anormal desta enzima causa várias doenças inflamatórias

severas, crônicas e ou agudas (BERNSTEIN, EDWARDS; WILLIANS, 1994). Por esta razão, a detecção e purificação de inibidores exógenos específicos para elastase de neutrófilos têm aumentado devido a suas aplicações terapêuticas nessas patologias (STERNLICHT *ET AL*., 1999).

Neste estudo o inibidor de tripsina de soja SKTI foi isolado e purificado através da cromatografia de troca aniônica Resource Q e sua aplicação nos processos de injúria pulmonar aguda avaliada. Na purificação, foi observada a presença de cinco picos protéicos majoritários durante a eluição com gradiente salino, sendo o último pico eluído em torno de 0,3 M de NaCl. Este foi o único pico capaz de inibir de maneira acentuada a elastase neutrofílica. Todos os demais picos protéicos inibiram significamente a tripsina pancreática bovina. Tal comportamento de ligação dos inibidores do tipo Kunitz de sementes a colunas de carga positiva parece ser uma característica comum, o que nos leva a sugerir uma carga líquida protéica negativa de grande parte destes inibidores (BHATTACHARYYA *ET AL*., 2006, 2007; LINGARAJU; GOWDA, 2008; MACEDO *ET AL*., 2007; NAVNEET *ET AL*., 2008; PAIVA *ET AL*., 2006).

O pico protéico com atividade anti-elastásica foi reunido, concentrado, desalinizado e utilizado para os ensaios posteriores. Este material foi analisado por SDS-PAGE, onde foi observada a presença de uma única banda protéica com massa molecular de 19,7 kDa, e por filtração em gel, que revelou uma massa molecular de 19,5 kDa, uma característica extremamente importante quanto a difusão e diminuição de impedimento estérico dentro de micro sítios de inflamação inacessíveis para os inibidores endógenos de alta massa molecular.Os valores de massa molecular diferem bastante para os inibidores de elastase pois estes não se comportam de maneira homogênea, apresentando valores de 7, 14 e 17 kDa para *Boophilus microplus* (SASAKI; TANAKA, 2008), 18 kDa para o inibidor de *Bauhinia bauhinoides* (HANSEN ET AL.,2007), 22,4 kDa para o *de Cenchritis muricatus* (GONZALÉZ ET AL., 2006) e 11,6 kDa para o de *Tamarindus indica* (FOOK ET AL., 2005).

O SKTI purificado apresentou forte especificidade para ENH e tripsina e baixa atividade para quimotripsina. Especificidades de inibição diferentes foram encontrados para inibidor de Kunitz isolado de tubérculos de batata, como

PSPI-21, com massa molecular de 21 kDa, que se comportou como um potente inibidor de ENH e um inibidor de tripsina e quimotripsina (VALUEVA, REVINA, MOSOLOV, 1997). Para o inibidor purificado de tamarindo foi observado especificidade para ENH e tripsina pancreática bovina (FOOK *ET AL*., 2005) .

A IC_{50} para o SKTI foi de 8 $\mu g.mL^{-1}$(0,3 nM). Este valor foi menor do que aqueles encontrados por Johansson (2002), quando analisaram extratos protéicos de mais de 96 espécies de plantas com propriedades fitoterápicas. A IC_{50} do SKTI foi bastante inferior quando comparada ao do inibidor de elastase de tamarindo purificado por Fook *et al*. (2005), que foi de aproximadamente 55 $\mu g.mL^{-1}$, ressaltando uma forte afinidade do SKTI para a ENH.

A atividade hemolítica e a citotoxicidade sobre as células do sangue humano periférico foram avaliadas e não foram observados efeitos deletérios sobre as populações celulares, sanguíneas nem plaquetárias, na concentração utilizada (IC_{50}) revelando indícios de baixa citotoxicidade.

A citocalasina B foi usada juntamente com estimuladores PAF e fMLP nos ensaios de liberação de ENH. O efeito foi monitorado pela diminuição da formação de pNA (p-nitroanilida), produto de degradação do substrato colorimétrico SAAVpNA, específico para o ensaio da elastase de neutrófilo (Johansson, 2002). Na presença dos neutrófilos, muitas substâncias como fMLP, LPS, PAF e PMA são capazes de estimular a liberação das enzimas de grânulo e/ou radicais superóxidos. A estimulação por PAF resultou na ativação da cascata intracelular via p42/44, que culmina com os produtos de liberação de forma semelhante pelos indutores de receptores fMLP (Nick *et al*., 1997; Patrick, 2000). No ensaio de liberação de elastase, SKTI, na concentração 0.3 nM, inibiu a liberação de ENH em 70% e 83,1% quando os neutrófilos foram estimulados por fMLP e PAF, respectivamente. Esses resultados, bastante semelhantes de inibição por fMLP e PAF, demonstraram que ambas as vias são indiferentemente afetadas. A inibição da liberação da elastase é um forte indicativo de um composto anti-inflamatório que atua através da interação com os receptores testados. Este resultado foi diferente dos demonstrados por Fook *et al*. (2005), em que o inibidor denominado ITT preferencialmente afetou a via de ativação p38 MAPK, a qual é observada na ativação celular por PAF.

Atualmente, a pesquisa por compostos sintéticos ou naturais que atuem com tais receptores com o intuito de desenvolver novos compostos anti-inflamatórios são uma das áreas de maior investimento da indústria farmacêutica à nível mundial.

Os ensaios *in vivo* de indução da injúria pulmonar aguda por LPS em camundongos resultaram em inflamações pulmonares severas acompanhadas da formação de edema, hemorragias e aumento da atividade elastásica de acordo com modelos realizados anteriormente (BARTALESI ET AL., 2005; LUCATTELLI ET AL., 2005). Os resultados mostraram uma atividade significativamente suprimida pelos tratamentos com SKTI. A diminuição dos danos teciduais pulmonares foi confirmada por cortes histológicos, corados por hematoxilina-eosina, dos grupos controle e dos tratamentos por SKTI. Estes resultados demonstram o efeito terapêutico do SKTI sobre disfunções pulmonares relacionadas à proteólise exacerbada pela ENH. Em outro estudo de injúria pulmonar aguda, cobaias submetidas à inalação de LPS exibiram um aumento elevado nos níveis de atividade elastásica aferidos nos lavado broncoalveolares dos animais (NAGAI ET AL., 1991). A estimulação dos neutrófilos por LPS resulta na ativação de receptores de membrana (Toll-like), principalmente TLR-2 (via p65/p50) seguida de translocação para o núcleo do complexo NF-KB, resultando numa rápida degranulação enzimática e formação de espécies reativas de oxigênio (KURT-JONES ET AL., 2002).

A ausência de efeitos citotóxicos e hemolíticos do SKTI sobre as populações celulares sanguíneas foi observada tanto nos ensaios *in vitro* (sangue humano) como *in vivo* (sangue camundongos), além de aspectos normais dos órgãos avaliados e às enzimas hepáticas. Uma baixa toxicidade nas concentrações avaliadas demonstra o potencial extremamente viável do SKTI como um agente bioativo contra as doenças inflamatórias relacionadas à disfunção corporal, no controle da proteólise exacerbada da elastase neutrofílica. Estudos adicionais são necessários para confirmar a segurança deste inibidor como um agente farmacológico.

6 **CONCLUSÕES**

- O inibidor de tripsina de soja altamente específico para ENH (IC_{50} 0.3 nM) foi purificado através de um único passo cromatográfico: troca aniônica em coluna de Resource Q;

- A análise do efeito citotóxico e/ou hemolítico do SKTI sobre populações celulares do sangue total de indivíduos sadios mostrou a não toxicidade deste inibidor;

- O SKTI foi capaz de inibir ambas as vias de liberação de ENH estimuladas por PAF e fMLP (83,1% e 70 %, respectivamente), tornando-o um forte candidato para o desenvolvimento de drogas e uso em terapias que possam auxiliar no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e agudas de caráter infeccioso ou não infeccioso;

- O SKTI foi eficaz no processo de injúria pulmonar aguda induzida por LPS, diminuindo o edema pulmonar, eventos hemorrágicos e níveis de atividade elastásica, reduzindo significativamente o influxo de células inflamatórias, dano tecidual e formação excessiva de exsudato;

- O SKTI não revelou efeitos tóxicos ou deletérios em ensaios de toxicidade aguda em camundongos, não demonstrando alteração na massa dos órgãos, contagem celular sanguínea e níveis séricos de transaminases, demonstrando sua baixa toxicidade quando administrado periodicamente em concentrações de até 1000 µg/kg.

REFERÊNCIAS

ADKISON, A.M. et al. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis.**J Clin Invest**, [S.l.], v. 109, p. 363-71, 2002.

ANDERSON, J.W; MAJOR, A.W. Pulsesand lipaemia, short- and long-term effect: potential in the prevention of cardiovascular disease. **Br. J. Nutr,** [S.l.], v**.** 88, p. 263-271, 2002.

ARAÚJO, C. L. et al. Biological activity of proteins from pupls of tropical fruits. **Food Chem**, [S.l.], v. 5, p. 107-110, 2004.

AZARKAN, M. et al.The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β-sheet glycoprotein. **Biochim. Biophys. Acta,** [S.l.], v. 1764, p. 1063-1072, 2006.

BAGGIOLINI, M; RUCH, W; COOPER, P.H. Measurement of hydrogen peroxide production by phagocytes using homovanillic acid and horseradish peroxidase. **Methods Enzymol**, [S.l.], v. 132, p. 395–400, 1986.

BARRINGTON, R. et al. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunol Rev**, [S.l.], 180-185, 2001.

BARTALESI, B. et al. Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. **Eur Respir J** [S.l.], v. 25, p. 15–22, 2005.

BATISTA, I. F. C. et al. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 41, p. 1017-1022, 1996.

BAUDYS, M. et al. Crystallization and preliminary crystallographic study of cathepsin D inhibitors from potatoes. **J. Mol. Biol**, [S.l.], v. 218, p. 21-22, 1991.

BEDARD, M., MCCLURE, C.D., SCHILLER, N.L., FRANCOEUR, C., CANTIN, A., DENIS,M. Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol,** [S.l.] v.9, p. 455– 462, 1993.

BERNSTEIN, P.R.; EDWARDS, P.D.; WILLIAMS, J. C. Inhibitors of human leukocyte elastase. **Prog. Med. Chem.**, [S.l.] v. 31, p.59-120, 1994.

BEVILACQUA, M.P; NELSON, R.M. Selectins. **J Clin Invest,** [S.l.], v**.** 91, p. 379-87, 1993.

BHAT, A. V; PATTABIRAMAN, T. N. Protease inhibitors from jackfruit seed (*Artocarpus integrifolia*). **J. Biosci**, [S.l.], v. 14, p. 351-365, 1989.

BHATTACHARYYA, A; LEIGHTON, S. M; BABU, C.R. Bioinsecticidal activity of Archidendron ellipticum trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of Spodoptera litura. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol,** [S.l.], v. 145, p. 669-677, 2007.

BHATTACHARYYA, A. et al. BaburBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick Boophilus microplus, its cloning, expression and biochemical characterization. **Vet. Parasitol**, [S.l.], v. 155, p. 133-141, 2008.

_____. et al. Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 67, p. 232-241, 2006.

BHATTACHARYYA, A; RAI, S; BABU, C. R. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from Caesalpinia bonduc seeds: Isolation, partical characterization and insecticidal properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 45, p. 169-177, 2007.

BIETH, J.G. In vivo significance of kinetic constants of macromolecular proteinase inhibitors. **Adv. Exp. Med. Biol**, [S.l.], v. 167, p. 97-109, 1984.

BODE, W; MEYER, J.E; POWERS, J.C. Human leukocyte and porcine elastase: x-ray. **Biochem. J**, [S.l.], v. 193, p. 193-202, 1989.

_____. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **Eur. J. Biochem**, [S.l.], v. 204, p. 433-451, 1992.

BODE, W; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinases-protein inhibitor interaction. **Biochim. Biophys. Acta**, [S.l.], v. 1477, p. 241-252, 2000.

BOSTERLING, B; QUAST, U. Soybean trypsin inhibitor (Kunitz) is doubleheaded. Kinetics of the interaction of alpha-chymotrypsin with each site. **Biochim. Biophys. Acta**, [S.l.], v. 657, p. 58-72, 1981.

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

BRZIN, J; KIDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev**, [S.l.], v. 13, p. 421-467, 1995.

CAI, T.Q; WRIGHT, S.D. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. **J. Exp. Med**, [S.l.], v. 184, p. 1213–1223, 1996.

CAMPBELL, E.J. et al. Quantum proteolysis by neutrophils: implications for pulmonary emphysema in alpha 1-antitrypsin deficiency. **J. Clin. Invest**, [S.l.], v.104, p. 337– 344, 1999.

CAMPOS, J. E. et al. Unusual structural characterization and complete amino acid sequence of a protease inhibitor from *Phaseolus acutifolius* seeds. **Plant Physiol. Biochem**, [S.l.], v. 42, p. 209-214, 2004.

CARDEN, D. et al. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. **Am J Physiol**, [S.l.], v. 13, p. 275-277, 1998.

CARNEY, D.E. et al. Metalloproteinase inhibition prevents acute respiratory distress syndrome. **J. Surg. Res**, [S.l.], v. 99, p. 245–252, 2001.

CAVALCANTI, M. S. M. et al. Characterization of a kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, [S.l.], v. 29, p. 635-639, 2002.

CEPINSKAS, G; NOSEWORTHY, R; KVIETYS, P.R. Transendothelial neutrophil migration. Role of neutrophil-derived proteases and relationship to transendothelial protein movement. **Circ. Res**, [S.l.], v. 81, p. 618– 626, 1997.

CHAUDHARY, N.S. et al. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from Putranjiva roxburghii seeds. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 69, p. 2120-2126, 2008.

CHRISTINE, S. et al. Leukocyte Effects of C5a-Receptor Blockade During Simulated Extracorporeal Circulation. **Ann. Thorac. Surg**, [S.l.], v. 83, p. 146-152, 2007.

DESHIMARU, M. et al. Purificação, amino acid sequence, and cDNA cloning of trypsin inhibitors from Onion (*Allium cepa L.*) bulbs. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, [S.l.], v. 67, p. 1653-1659, 2003.

DÖRING, G. et al. Allotypes of alpha 1-antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for deltaF508. **Pediatr Pulmonol**, [S.l.], v. 18, p. 3-7, 1994.

EDWARDS, P.D; BERNSTEIN, P.R. Synthetic inhibitors of elastase. **Med. Res. Rev**, [S.l.], v. 14, p. 127–194, 1994.

FAURSCHOU, M; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, [S.l.], v. 14, p. 1317-1327, 2003.

FISCHER, B. M; VOYNOW, J. A. Neutrophil elastase induces MUC5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species. **Am J Respir Cell Mol Biol**, [S.l.], v. 26, p. 447–452, 2002.

FOOK, J.M.S.L.L., MACEDO, L.L.P., MOURA, G.E.D.D., TEIXEIRA, F.M., OLIVEIRA, A.S., QUEIROZ A.F.S., SALES, M.P. A serine proteinase inhibitor isolated from Tamarindus indica seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. **Life Sci**, [S.l.], v. 76, p. 2881-2891, 2005.

GADEK, J.E; PATCH, E.R. The proteinase antiproteinase balance within the human lung. Implications for the pathogeneses of emphysema. **Lung Suppl**, [S.l.], v. 12, p. 552-564, 1990.

GINZEBERG, H. H. et al. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, [S.l.], v. 3, p. 281-284, 2001.

GOMES, Carlos Eduardo Maia. et al. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (Fruit fly). **Plant Physiol. Biochem**, [S.l.], v. 43, p. 1095-1102, 2005a.

GOMES, A. P. G. et al. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol**, [S.l.], v. 140, p. 313–319, 2005b.

GONZÁLEZ, Y. et al. Purification and partial characterization of human neutrophil elastase inhibitors from the marine snail Cenchritis murisca (Mollusca). **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol**, [S.l.], v. 146, p. 506-513, 2006.

GOPALAN, P.K. et al. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. **J Immunol**, [S.l.], v. 158, p. 367-375, 1997.

GOSSAGE, J.R. et al. Neutrophil elastase inhibitors, SC-37698 and SC-39026, reduce endotoxin-induced lung dysfunction in awake sheep. **Am. Rev. Resp. Dis**, [S.l.], v. 147, p. 1371-1380, 1993.

GREEN, B.G. et al. PMN elastases: a comparison of the specificity of human isozymes and the enzyme from other species toward substrates and inhibitors, **Arch. Biochem**. **Biophys**, [S.l.], v. 286, p. 143-148, 1991.

GREER, R. M. et al. Vitamin A levels in patients with CF are influenced by the inflammatory response. **J. Cyst. Fibros**, [S.l.], v. 3, p. 143-149, 2004.

HANSEN, G. Alpha 1-proteinase inhibitor abrogates proteolytic and secretatogue activity of cystic fibrosis sputum. **Respiration**, [S.l.], v. 62, p. 117-124, 1995.

HANSEN, D; RIBEIRO, S. M; VERÍSSIMO, P. Crystal structure of a novel cysteinless plant Kunitz-type protease inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, [S.l.], v. 360, p. 735-740, 2007.

HARIBABU, B. et al. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. **J Biol Chem**, [S.l.], v. 272, p. 26-31, 1997.

HAVEMANN, K; GRAMSE, M. Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes. **Adv. Exp. Med. Biol**, [S.l.], v. 167, p. 1-20, 1984.

HIEMSTRA, P. S. et al. Antimicrobial proteins of murine macrophages. **Infect Immun**, [S.l.], v. 61, p. 3038-3046, 1993.

HIROYKI, O. Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD. **Expert Opin Investig Drugs**, [S.l.], v. 7, p. 965-980, 2002.

HOJIMA, Y; PISANO, J.J; COCHRANE, C.G. Survey of plant inhibitors of polymorphonuclear leukocyte elastase, pancreatic elastase, cathepsin G, cathepsin B, hageman factor fragments, and other serine proteinases. **Biochem. Pharmacol**, [S.l.], v. 32, p. 985-990, 1983.

HOLT, S; MUNTYAN, I; LIKYER ,L. Soybean-based diets for Diabetes Mellitus. **Altern Complement Ther**, [S.l.], March/April, p. 387-389, 1996.

ISHIZAWA, K. et al. Bone marrow derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. **FEBS Lett**, [S.l.], v. 556, p. 249–252, 2004.

JAESCHKE, H; SMITH, C.W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. **J Leukoc Biol**, [S.l.], v**.** 6, p. 647-653, 1997.

JANOFF, A; SCHERER, J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. **J ExpMed**, [S.l.], v. 128, p. 1137-55, 1968.

JOHANSSON S. U. Neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **J. Nat . Prod**, [S.l.], v. 65, p. 32-41, 2002.

JOHNSTON, B; BUTCHER, E.C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. **Semin Immunol**, [S.l.], v. 14, p.83-88, 2002.

KAWABATA, K; MOORE, A. R; WILLOUGHBY, D. A. Impaired activity of protease inhibitors towards neutrophil elastase bound to human articular cartilage. **Ann. Rheum. Dis**, [S.l.], v. 55, p. 248–252, 1996.

KENNEDY, A.R. Chemopreventive Agents: Proteases Inhibitors. **Pharmacol. Ther**, [S.l.], v. 78, p. 167-209, 1998.

KORKMAZ, B; MOREAU, T; GAUTHIER, F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. **Biochimie**, [S.l.], v. 90, p. 227-242, 2007.

KOIWA, H; BRESSAN, R. A; HASEGAWA, P. M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends Plant Sci**, [S.l.], v. 2, p. 379-384, 1997.

KRAMPS, J.A; VAN TWISK, C; DIJKMAN, J.H. Oxidative inactivation of bronchial antileukoprotease by triggered polymorphonuclear leukocytes.
Am. Rev. Respir. Dis, [S.l.], v.135, p. 290-295, 1987.

KURT-JONES, E.A et al. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. **Blood**, [S.l.], v. 100, p. 1860-1868, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, [S.l.], v. 227, p. 680–685, 1970.

LAI, Z. et al. Potent inhibition of human leukocyte elastase by 1,2,5-thiadiazolidin-3-one 1,1 dioxide-based sulfonamide derivates. **Arch. Biochem. Biophys**, [S.l.], v. 429, p. 191-197, 2004.

LARIONOVA, N.I. et al. Inhibition of cathepsin G and elastase from human granulocytes by multiple forms of the Bowman-Birk type of soy inhibitor. **Biokhimiia**, [S.l.], p. 1437-1444, 1993.

LASKY, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation.**Science**, [S.l.], v. 258, n.5084, p. 964-969, 1992.

LAWRENCE, P. L; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electron. J. Biotechnol**, [S.l.], v. 5, p. 93-109, 2002.

LEE, C.T., FEIN, A.M., LIPPMANN, M., HOLTZMAN, H., KIMBEL, P., WEINBAUM, G. Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. **N. Engl. J. Med.**, [S.l.] 304, 192– 196, 1981.

LEE, W. L; DOWNEY, G. P. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, [S.l.], v. 164, p. 896–904, 2001.

LIAU, T.G; CAMPBELL, E.J. Nonisotropic enzyme–inhibitor interactions: a novel mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. **Biochemistry**, [S.l.], v. 34, p. 16171–16177, 1995.

LINGARAJU, M.H; GOWDA, L. R.. A Kunitz trypsin inhibitor of Entada scandens seeds: Another member with single disulfide bridge. **Biochim. Biophys. Acta**, [S.l.], v. 1784, p. 850-855, 2008.

LIOU, TG; CAMPBELL, EJ. Nonisotropic enzyme--inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. **Biochemistry**. [S.l.], v. 12;p.34-49, 1995.

LUCATTELLI, M. et al. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. **J. Mol. Biol,** [S.l.], v. 290, p. 525-533, 1999.

LUCATTELLI, M., ET AL. Is neutrophil elastase the missing link between emphysema and fibrosis? Evidence from two mouse models. ***Respir Res***, [S.l.] v.*6*, p.83–96, 2005.

MACEDO, M. L. R. et al. Characterization of a kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Ingra laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 68, p. 1104-111, 2007.

_____. A kunitz-type inhibitor of Coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **J. Agric. Food Chem**, [S.l.], v**.** 52, p. 2533-2540, 2004.

MARGIS, R; REIS, E. M; VILLET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Arch. Biochem. Biophys,** [S.l.], v. 359, p. 24-30, 1998.

MARTORANA, P. A. Is neutrophil elastase the missing link between emphysema and fibrosis? Evidence from two mouse models. **Respir Res**, [S.l.], v. 6, p. 83-96, 2005.

MATHESON, N.R; WONG, P.S; TRAVIS, J. Enzymatic inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, [S.l.], v**.** 88, p. 402– 409, 1979.

MCGARVEY, L.P.A. et al. Cytokine concentrations and neutrophil elastase activity in bronchoalveolar lavage and induced sputum from patients with cystic fibrosis, mild asthma and healthy volunteers. **J. Cyst. Fibros**. [S.l.], v. 1, p. 269 275, 2002.

MCGUIRE, W. et al. Studies on the pathogenesis of adult respiratory distress syndrome. **J. Clin. Invest**, [S.l.], v. 69, p. 543–553, 1982.

MESSINA, M.J. In The Simple Soybean and Your Health. **Avery Publishing Group, New York**, [S.l.], p. 150-151. 1994.

MOODLEY, Y.P; KRISHNAN, V; LALLOO, U.G. Neutrophils in induced sputum arise from central airways. **Eur. Respir. J**, [S.l.], v. 15, p. 36-40, 2000.

MOORE, A.R. et al. Destruction of articular cartilage by alpha 2 macroglobulin elastase complexes: role in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum**. **Dis,** [S.l.], v. 58, p. 109– 113, 1999.

NAGAI, H. et al. Participation of collagenase and elastase in LPS-induced airway hyper responsiveness in guinea pigs. **Inflammation**, [S.l.], v. 15, p. 317-330, 1991.

NAKAMURA, H. et al. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. **J. Clin. Invest**, [S.l.], v. 89, p. 1478– 1484, 1992.

NAKAYAMA, Y. et al. Clarification of mechanism of human sputum elastase Inhibition by a new Inhibitor, ONO-5046, using electrospray ionization mass spectrometry. **Bioorg. Med. Chem. Lett,** [S.l.], v. 12, p. 2349–2353, 2002.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, [S.l.], v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.

_____. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, [S.l.], v. 6, p. 173–182, 2006.

NAVNEET, S. et al. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from Putranjiva roxburghii seeds. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 69, p. 2120-2126, 2008.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends Biochem. Sci**, [S.l.], v. 14, p. 268-271, 1989.

NICK, J.A. et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and fMLP. **J. Clin. Invest**, [S.l.], v. 99, p. 975-986, 1997.

NORIOKA, N. et al. Distribution of the Kunitz and Bowman-Birk family proteinase inhibitor in leguminosae seeds. **Agric. Biol. Chem**, [S.l.], v. 52, p. 1245-1252, 1988.

O'CONNER, C.M. et al. Alpha 1-proteinase inhibitor, elastase activity and lung disease severity in cystic fibrosis. **Am. Rev. Respir. Dis**, [S.l.], v. 148, p. 1665-1670, 1993.

ODANI, S. et al. The primary structure and characterization of carbohydrate chains of the extracellular glycoproteinase inhibitor from látex of *Carica papaya*. **Eur. J.Biochem**, [S.l.], v. 241, p. 70-82, 1996.

OHLSSON, K; OLSSON, I. The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases. **Eur. J.Biochem.** [S.l.], v. 42, p. 519– 527, 1974.

OLIVEIRA, A. E. A; XAVIER-FILHO, J ; SALES, M. P. Cystein proteinases and cystatins. **Braz Arch Biol Technol**, [S.l.], v. 46, p. 91-104, 2003.

OLIVEIRA, A. S. et al. Identification of a Kunitz-type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. **J. Agric. Food Chem**, [S.l.], v. 55, p. 7342-7349, 2007.

_____. et al. Two Kunitz-type Inhibitors with activity against trypsin and papain from *Pithecellobium dumosum* seeds: Purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. **Protein Pept. Lett**, [S.l.], v. 12, p. 1526-1532, 2009.

OWEN, C.A. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils.A novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. **J. Cell Biol**, [S.l.], v. 131, p. 775-789, 1995.

_____. Cytokines regulate membrane-bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity. **Am J Physiol**, [S.l.], v. 272, p. 385-393, 1997.

PAIVA, P.M.G. et al. Purification and primary structure determination of two Bowman–Birk type trypsin isoinhibitors from Cratylia mollis seeds. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 67, p. 545-552, 2006.

PATRICK, D.A.I. Maximal human neutrophil priming for superoxide production and elastase release requires p38 mitogen-activated protein kinase activation, **Arch. Surg**, [S.l.], v. 35, p. 219-225, 2000.

RAO ,S. K; REDDY, K. V; COHEN ,J. R. Role of serine proteases in aneurysm development. **Ann N Y Acad Sci**, [S.l.], v. 18, p. 131-137, 1996.

REEVES, J.H. A review of plasma exchange in sepsis. **Blood Purif**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 282-288. Review. 2002.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: Methods in plants Biochemistry. **New York, Academic Press**, [S.l.], v. 5, p. 259-305. 1991.

RICKERT, P. et al. Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. **Trends Cell Biol**, [S.l.], v.11, p. 466-473, 2000.

RITONJA, A. et al. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Lett**, [S.l.], v. 504, p. 41-44, 1990.

RODENBURG, K. W. et al. Arg-27, arg-127 and arg-155 in the α-trefoil protein barley α-amylase/subtilisin inhibitor are interface residues in the complex with barley α-amylase. **Biochem. J**, [S.l.], v. 309, p. 969-976, 1995.

RUI-FENG, Q.I; SONG, Z; CHI ,C. Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Protease.Inhibitors and Their Potential Application. **Acta Biochim. Biophys. Sin**, [S.l.], v. 37, p. 283–292, 2005.

RYAN, C. A. Protease inhibitor in plants: Genes for Improving defenses against insects and pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, [S.l.], v. 28, p. 425-449, 1990.

SASAKI, S. D; TANAKA, A. S. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick Boophilus microplus, its cloning, expression and biochemical characterization**. Vet. Parasitol**, [S.l.], v. 155, p. 133-141, 2008.

SCHEPPACH, W; LUETHRS, H; MELCHER, R. Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. **Clin Nutr Supp**, [S.l.], v. 1, p. 51-58. 2004.

SCHULER, T. H. et al. Insect-resistant transgenic plants. **Trends Biotechnol**, [S.l.], v. 16, p. 168-175, 1998.

SETCHELL, K.D.R; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. **J Nutr**, [S.l.], v. 129, p. 758-767. 1999.

SHAPIRO, S. D. Neutrophil Elastase PathClearer,Pathogen Killer, or JustPathologic? **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, [S.l.], v. 26, p. 266–268, 2002.

SHAPIRO, S. D. et al. neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-Induced emphysema in mice. **Am. J. Pathol**, [S.l.],v.6, p.163-167, 2003.

SIEDLE, L.G. et al. The effect of sesquiterpene lactonas on the release of human neutrophil elastase. **Biochem. Pharmacol***,* [S.l.], v. 7559, p. 1-7, 2003.

SIMON, S.I. et al. Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18. **J Immunol**, [S.l.], v. 163, p. 2891-2901, 1999.

SNIDER, G. L. Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. **Annu Rev Med**, [S.l.], v. 40, p. 411–429, 1989.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. **Cell***,* [S.l.], v. 76, p. 301-314, 1994.

STEADMAN, R. et al. Laminin cleavage by activated human neutrophils yields proteolytic fragments with selective migratory properties. J. **Leukoc. Biol**, [S.l.], v. 53, p. 354–365, 1993.

STERNLICHT, M. D. et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis.**Cell,** [S.l..], v. 23, p. 137-146, 1999.

STONE, P. J. et al. Role of alphamacroglobulin–elastase complexes in the pathogenesis of elastase-induced emphysema in hamsters. **J. Clin. Invest,** [S.l.], v. 69, p. 920– 931, 1982.

STOSSEL, T. P. Cell crawling two decades after Abercrombie. **Biochem Soc Symp**, [S.l.], v. 65, p. 267-280,1999.

STUART, L.M; EZEKOWITZ, R.A. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, [S.l.], v. 5, p. 539-550, 2005.

SULLIVAN, A. L. et al. Neutrophil elastase reduces secretion of secretory leukoproteinase inhibitor (SLPI) by lung epithelial cells: role of charge of the proteinase-inhibitor complex. **Respir. Res**, [S.l.], v. 9, p. 60-75, 2008.

SUMIKAWA, J. T. et al. Kunitz-type glycosylated elastase inhibitor with one disulfide bridge. **Planta Med**, [S.l.], v. 72, p. 393-397, 2006.

TAKAHASHI, H. et al. Structure of the human neutrophil elastase gene. **J Biol Chem**, [S.l.], v**.** 263, p. 29-32, 1988.

TRONCOSO, M.F; ZOLEZZI, P.C; HELLMAN, U. Wolfenstein-Todel C. A novel trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. **Arch. Biochem. Biophys**, [S.l.], v**.** 411, p. 93-104, 2003.

TWUMASI, D.Y; LIENER, I.E. Proteases from purulent sputum. Purification and properties of the elastase and chymotrypsin-like enzymes, **J. Biol.Chem**, [S.l.], v. 252, p. 1917-1926, 1977.

USSUF, K. K; LAXMI, N. H; MITRA, R. Proteinase inhibitors: plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Curr. Sci,** [S.l.], v. 80, p. 847-853, 2001.

VALUEVA, T. A; REVINA, T. A; MOSOLOV, V. V. Potato tuber protein proteinase inhibitor belonging to the kunitz soybean inhibitor family. **Biochemistry**, [S.l.], v. 62, p. 1367-1600, 1997.

VAN DER FLIER, A; SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. **Cell Tissue Res**. [S.l.], v. 305, p. 285-298, 2001.

VARKI, A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? **J Clin Invest,** [S.l.], v. 100, p. 31-35. 1997.

VIRCA, G. D; SALVESEN, G. S; TRAVIS, J. Human neutrophil elastase and cathepsin G cleavage sites in the bait region of alpha 2-macroglobulin. Proposed structural limits of the bait region. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem,** [S.l.], v. 364, p. 1297-1302, 1983.

VIRCA, G. D. et al. Quantitation of human leukocyte elastase, cathepsin G, alpha-2-macroglobulin and alpha-1-proteinase inhibitor in osteoarthrosis and rheumatoid arthritis synovial fluids. **Adv Exp Med Biol,** [S.l.], v. 167, p. 345-353. 1984.

WATOREK, W; HALBEEK, H. H. V; TRAVIS, J. The isoforms of human neutrophil elastase and cathepsin G differ in their carbohydrate side chain structures, **Biol. Chem,** [S.l.], v. 374, p. 108-112, 1994.

.

WEBER, K; OSBORNE, M. The reability of molecular weight determination by sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel eletroforesis. **J. Boil. Chem**, [S.l.], v. 244, p. 4406-4412, 1969.

WEISMAN, G. **Inflammation historical perspectives**: Basical principles and clinical correlates. New York: raven press, 1992.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. Med**, [S.l.], v. 320, p. 365–376, 1989.

WIENER-KRONISH, J. P; GROPPER, M. A; MATTHAY, M. A. The adult respiratory distress syndrome: definition and prognosis, pathogenesis and treatment. **Br. J. Anaesth**. [S.l.], v. 65, p. 107–129, 1990.

WILLIAM, A.Z; NORTON, P.P. Inhibitors of human neutrophil elastase activity in the adult respiratory distress syndrome is complexed to alpha-2-macroglobulin. **J. Clin. Invest.** [S.l.], v. 82, p. 1260– 1267, 1999.

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. **Organização dos Estados Americanos-OEA**. 1993.

XAVIER-FILHO, J; CAMPOS, F.A.P. Inibidores de enzima proteolíticas em plantas. **Arq. Biol. Tecnol**, [S.l.], v. 27, p. 407-417, 1984.

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