

Ilana Cruz Silva

**INIBIDORES DE PEPTIDASES DAS SEMENTES DE
PAU-BRASIL EM MODELO DE INFLAMAÇÃO
PULMONAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

São Paulo

2010

Ilana Cruz Silva

**INIBIDORES DE PEPTIDASES DAS SEMENTES DE
PAU-BRASIL EM MODELO DE INFLAMAÇÃO
PULMONAR**

Tese preparada no Departamento de Bioquímica, durante o Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e apresentada à Universidade Federal de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo

Co-orientadora: Profa. Dra. Aparecida Sadae Tanaka

São Paulo

2010

Cruz-Silva, Ilana

Inibidores de peptidases das sementes de pau-brasil em modelo de inflamação pulmonar/ Ilana Cruz Silva.-- São Paulo, 2010.

xxvi, 146f

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular.

Título em inglês: Peptidase inhibitors from pau-brasil seeds on a pulmonary inflammation model.

1. *Caesalpinia echinata* (pau-brasil). 2. inibidores de proteases. 3. edema pulmonar. 4. elastase. 5. catepsina G.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Marimélia Aparecida Porcionatto

Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Ilana Cruz Silva

**INIBIDORES DE PEPTIDASES DAS SEMENTES DE
PAU-BRASIL EM MODELO DE INFLAMAÇÃO
PULMONAR**

Presidente da Banca: Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal

Prof. Dra. Viviane Abreu Nunes

Profa. Dra. Paulina Sannomiya

Suplente: Profa. Dra. Carla Cristina Lopes de Azevedo

Suplente: Prof. Dr. Sergio Daishi Sasaki

Aprovada em: 08/07/2010

A Deus, que guia e direciona todos os instantes da minha vida.

Aos meus pais, José Antônio e Vera Lúcia, pelo apoio e por me moldarem como sou hoje.

À minha irmã Elita, por secar muitas das minhas lágrimas e pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, que não foram poucos.

Ao meu irmão Alexandre, pelo carinho e o suporte de todas as horas.

Aos meus cunhados, Márcio e Camila, pela motivação, admiração e alegria de sempre.

Aos meus sobrinhos Gabriela, Livia e Breno, em especial, por ajudarem a manter a criança que tenho em mim.

Às Marianas (todas elas) que me dão o apoio e suporte em minhas loucuras; em especial à Calzavara que ouve meus desabafos e, muitas vezes, considera minhas verdades como certas.

Ao Prof. Dr. Cláudio Augusto Machado Sampaio (*In Memoriam*), pela orientação e oportunidades, pelo exemplo de pesquisador e, sobretudo, por ter depositado sua confiança em mim.

À Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo, pela orientação, confiança e liberdade científica. Por me acolher e defender como filha, sem esquecer do lado profissional.

Esse trabalho foi parcialmente apoiado por:

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAP - Fundação de Apoio à UNIFESP

Agradecimentos

Gostaria de expressar toda minha gratidão àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse trabalho.

À Profa. Dra. Aparecida Sadae Tanaka, pela orientação na parte de Biologia Molecular da Tese e pelas palavras encorajadoras nos meus momentos de desânimo.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Figueiredo Ribeiro que, além de fornecer as sementes de *Caesalpinia echinata*, esteve sempre pronta para discussão dos resultados e entusiasmada na união da “família do pau-brasil”.

À Profa. Dra. Adriana Carmona, pela disponibilidade constante e valiosas sugestões.

À Profa. Dra. Viviane Abreu Nunes, pelas sugestões sempre muito proveitosas, pela ajuda constante e pelas “dicas” de uma biomédica bem sucedida e empolgada pela carreira.

Aos demais docentes dos Departamentos de Bioquímica e Biofísica, pelas sugestões e doação de material necessário para o trabalho.

À Dra. Andrezza Justino Gozzo Andreotti, por voltar, ajudar e melhorar o grupo, e por compartilhar sua experiência na minha vida pessoal e profissional.

À Priscila Praxedes Garcia, por trazer uma melhor organização do laboratório e pelas palavras amigas nas horas difíceis.

À Mariana Domingos, por estar sempre comigo dentro e fora do laboratório.

Às Evelyn, Indianara, Nayara, Viviane Priscila e Fernanda, por tornarem o dia-a-dia mais agradável.

Ao Roberto Rodriguez Cabrera, pelas melhorias na infraestrutura do laboratório.

Aos Ricardo José Soares Torquato, Sergio Daishi Sasaki e Diogo Ventura Lovato, por me acolherem e me dedicarem parte do seu tempo, no laboratório onde desenvolvi parte da tese.

Ao Michele Labriola que trouxe paz num dos momentos mais turbulentos da minha vida.

À Priscila Otomo (Med-74), pela dupla que formamos não só nos treinos longos e cansativos, mas também pela injeção diária de ânimo, de autoconfiança e produção de serotonina.

Aos meus antigos amigos da S-34 e novos amigos da 75, pelos momentos de descontração e estudos e pelos projetos nem sempre concretizados.

Sumário

Dedicatórias.....	v
Agradecimentos.....	ix
Listas de figuras e tabelas, abreviaturas e aminoácidos.....	xv
Parecer do Comitê de ética.....	xxiv
Resumo.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Edema pulmonar.....	1
1.2 Enzimas e inibidores endógenos na inflamação.....	1
1.3 Interação proteases e citocinas na inflamação.....	7
1.4 Controle de Peptidases.....	8
1.5 Peptidase e inibidores extraídos de plantas.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL.....	15
4. MÉTODOS.....	22
4.1 Métodos de Biologia Molecular.....	22
4.1.1 Eletroforese em gel de agarose.....	22
4.1.2 Purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose.....	23
4.1.3 Precipitação do DNA por etanol.....	23
4.1.4 Quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria.....	23
4.1.5 Seqüenciamento automático de DNA.....	24
4.2 Expressão dos CeEIs recombinantes.....	24
4.2.1 Preparação de bactérias <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) cepa <i>Rosetta Gami</i> competentes para choque térmico.....	24
4.2.2 Transformação de bactérias competentes <i>E. coli</i> cepa <i>Rosetta Gami</i> por choque térmico.....	25
4.2.3 Análise das colônias de <i>E. coli</i> transformadas.....	25
4.2.4 Expressão dos CeEI recombinantes em escala analítica.....	25
4.2.5 Extração e análise de proteínas do lisado total de bactérias.....	26
4.2.6 Expressão dos CeEI recombinantes em escala preparativa.....	26
4.2.7 Obtenção das proteínas citoplasmáticas solúveis.....	26
4.3 Purificação dos CeEIs recombinantes.....	27
4.3.1 Cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose.....	27

4.3.2 Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF conectada a um sistema HPLC.....	27
4.3.3 Filtração em gel em coluna PD10.....	27
4.4 Caracterização dos CeEIs recombinantes.....	28
4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	28
4.4.2 Determinação da atividade dos inibidores recombinantes sobre a ação de diferentes enzimas.....	29
4.4.3 Determinação das constantes inibitórias (K_i).....	29
4.5 Estudos cinéticos da ação dos inibidores recombinantes sobre a atividade da EN.....	30
4.6 Determinação do menor fragmento ativo do inibidor CeEI.....	30
4.6.1 Construção dos oligonucleotídeos.....	31
4.6.2 Amplificação dos fragmentos de DNA de CeEI por PCR.....	32
4.6.3 Clonagem do produto de PCR em vetor de clonagem pGEM [®] -T easy.....	32
4.6.4 Midi preparação do DNA plasmidial.....	33
4.6.5 Digestão de DNA com enzima de restrição.....	33
4.6.7 Reação de ligação de fragmentos de DNA ao plasmídeo pET-26b.....	34
4.6.8 Linearização do plasmídeo pPIC9K para eletroporação em leveduras <i>Pichia pastoris</i> competentes.....	34
4.6.9 Transformação de bactérias competentes <i>E. coli</i> cepa TG1 por eletroporação....	34
4.6.10 Transformação de bactérias competentes da cepa <i>BL21SI</i> de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	35
4.6.11 Expressão dos fragmentos de CeEIs recombinantes em escala analítica em bactérias.....	35
4.6.12 Expressão do fragmento de CeEI recombinante em escala preparativa em bactérias.....	35
4.7 Transformação, análise e expressão de proteína em leveduras.....	36
4.7.2 Preparação de leveduras competentes de <i>Pichia pastoris</i> para eletroporação....	36
4.7.3 Eletroporação de leveduras <i>Pichia pastoris</i> competentes	36
4.7.4 Expressão do fragmento de CeEI recombinante em escala analítica em leveduras.....	36
4.7.5 Expressão do fragmento de CeEI recombinante em escala preparativa em leveduras.....	37
4.8 Purificação dos fragmentos de CeEI recombinantes expressos em bactérias.....	37

4.8.1 Obtenção das proteínas do periplasma das bactérias.....	37
4.8.2 Cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose.....	38
4.8.3 Filtração em gel em coluna PD10.....	38
4.8.4 Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrapQ-FF conectada em sistema FPLC.....	38
4.8.5 Filtração em gel em coluna Superdex G-30.....	38
4.8.6 Cromatografia de fase reversa em coluna C ₁₈	39
4.9 Purificação dos fragmentos de CeEI recombinantes expressos em leveduras.....	39
4.9.1 Obtenção das proteínas do meio de cultura das leveduras.....	39
4.9.2 Fracionamento por acetona.....	39
4.9.3 Filtração em gel em coluna Superdex G-75.....	39
4.9.4 Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF.....	39
4.9.5 Cromatografia de fase reversa em coluna C ₁₈	40
4.10 Caracterização dos fragmentos de CeEI recombinantes.....	40
4.10.1 Determinação da atividade do fragmento 55 do inibidor.....	40
4.10.2 Determinação da seqüência N-terminal dos fragmentos do inibidor recombinante.....	40
4.10.3 Determinação da atividade dos inibidores recombinantes.....	41
4.10.4 Determinação das concentrações ativas dos fragmentos.....	41
4.10.5 Cromatografia líquida/espectrometria de massa do fragmento 46.....	41
4.11 Modelo de edema pulmonar <i>in vivo</i>	42
4.11.1 Indução de edema pulmonar em ratos.....	42
4.11.2 Preparo das amostras de plasma, soro e pulmões dos animais.....	42
4.11.3 Contagem das células PMN no BAL.....	43
4.11.4 Determinação da quantidade total de proteínas nas amostras.....	43
4.11.5 Eletroforese das amostras de BAL.....	43
4.11.6 Verificação de atividade do tipo EN nas amostras.....	43
4.11.7 Extração de cinina do sangue, plasma, pulmão e BAL.....	44
4.11.8 Dosagem das cininas por radioimunoensaio.....	44
4.11.9 Verificação da atividade enzimática do tipo enzima conversora de angiotensina (ECA) nas amostras.....	45
4.11.10 Verificação da atividade enzimática do tipo de mieloperoxidase (MPO) nas amostras.....	45
4.11.11 Verificação da atividade enzimática do tipo Cat G nas amostras.....	46

4.11.12 Verificação de atividade inibitória para EN e Cat G nas amostras.....	46
4.11.13 Dosagem da quantidade de interleucina (IL)-6, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) nas amostras.....	46
4.11.14 Análise estatística.....	47
4.12 Padronização de uma cultura de células pulmonares do tipo II.....	47
4.12.1 Cultura de células de pulmão do tipo II.....	47
4.12.2 Caracterização das células em cultura.....	48
4.12.3 Avaliação da viabilidade das células pulmonares do tipo II no decorrer do tempo - curva de crescimento.....	48
4.12.4 Avaliação da ação de EN nas células do epitélio pulmonar do tipo II.....	49
4.12.5 Avaliação da proliferação celular.....	49
4.12.6 Avaliação da viabilidade e fragmentação nuclear.....	50
5. RESULTADOS	
5.1 Expressão dos CeEIs recombinantes.....	51
5.2 Purificação dos CeEIs recombinantes.....	52
5.2.1 Cromatografia de afinidade dos CeEIs recombinantes.....	52
5.2.2 Cromatografia de troca iônica dos CeEIs recombinantes.....	52
5.3 Caracterização dos CeEIs recombinantes.....	58
5.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	58
5.3.2 Determinação da atividade inibitória sobre diferentes serinoproteases.....	58
5.3.3 Determinação das constantes inibitórias (K_i).....	58
5.4 Estudos cinéticos do comportamento da EN.....	58
5.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos e do tipo de inibição da EN pelo rCeEI-4.....	62
5.4.2 Determinação dos parâmetros cinéticos e do tipo de inibição da EN pelo rCeEI-5.....	62
5.5 Determinação do menor fragmento ativo do inibidor rCeEI-4.....	68
5.6 Clonagem do menor fragmento de CeEI e expressão do menor peptídeo ativo de CeEI.....	73
5.7 Purificação dos fragmentos de CeEI recombinantes obtidos a partir de bactérias.....	73
5.7.1 Purificação do fragmento 36 de CeEI recombinante expresso em bactérias.....	73
5.7.2 Purificação do fragmento 46 de CeEI recombinante expresso em bactérias.....	74
5.7.3 Identificação do fragmento 46 por espectrometria de massa.....	74

5.7.4 Seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal dos fragmentos de CeEI recombinantes.....	74
5.8 Purificação do fragmento 36 de CeEI recombinante expresso em leveduras.....	80
5.9 Caracterização dos fragmentos 36 e 46 de rCeEI purificados.....	80
5.9.1 Determinação da atividade inibitória sobre EN.....	80
5.10 Modelo de edema pulmonar <i>in vivo</i>	83
5.10.1 Dosagem de proteínas.....	83
5.10.2 Eletroforese das amostras de BAL.....	83
5.10.3 Quantificação de PMN no BAL.....	83
5.10.4 Análise do BAL.....	85
5.10.5 Análise das atividades enzimáticas presentes no plasma ou do soro.....	90
5.9.6 Análise das atividades enzimáticas presentes no pulmão.....	90
5.9.7 Análise de marcadores inflamatórios.....	103
5.10 Caracterização da cultura de epitélio pulmonar do tipo II.....	109
5.10.1 Identificação da cultura de células pulmonares.....	109
5.10.2 Avaliação da viabilidade das células pulmonares do tipo II no decorrer do tempo - curva de crescimento.....	109
5.10.3 Avaliação do efeito da EN nas células pulmonares.....	109
6. DISCUSSÃO.....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
8. ABSTRACT	
9. CAPÍTULO DE LIVRO	
10. ARTIGO SUBMETIDO	
11. OUTRAS ATIVIDADES	

Lista de Figuras

FIGURA A: Representação esquemática de inibição baseada na estrutura do complexo inibidor de tripsina de <i>Cucurbita maxima</i> (I) e a tripsina (E).....	10
FIGURA B: <i>Caesalpinia echinata</i> (pau-brasil).....	13
FIGURA C: Mapa do plasmídeo de clonagem <i>pGEM[®]-T easy</i> e seqüência de nucleotídeos com os sítios de restrição da região de clonagem.....	18
FIGURA D: Mapa do plasmídeo de expressão pET-14b e seqüência de nucleotídeos com os sítios de restrição da região de clonagem.....	19
FIGURA E: Mapa do plasmídeo de expressão pET-26b e seqüência de nucleotídeos com os sítios de restrição da região de clonagem.....	20
FIGURA F: Mapa do plasmídeo de expressão pPIC9K para leveduras <i>Pichia pastoris</i> e eventos de integração do plasmídeo ao genoma da levedura.....	21
FIGURA 1: Comparação de seqüências de aminoácidos de CeEIs e outros inibidores de tripsina.....	53
FIGURA 2: Gel de agarose (1,2%) para verificação das transformações das colônias de <i>E. coli</i> cepa Rosetta gami.....	54
FIGURA 3: SDS-PAGE (12%) das proteínas de lisado de bactérias contendo o cDNA de rCeEI-4 e rCeEI-5.....	55
FIGURA 4: Cromatografias de afinidade em coluna Ni-Sepharose dos CeEIs recombinantes.....	56
FIGURA 5: Cromatografias de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF dos CeEIs recombinantes.....	57
FIGURA 6: SDS-PAGE (12%) dos CeEIs recombinantes nas diferentes etapas de purificação.....	59
FIGURA 7: Curvas de inibição de EN por rCeEI-4 e rCeEI-5.....	60
FIGURA 8: Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise do MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan por EN e da constante de inibição pelo rCeEI-4.....	63
FIGURA 9: Determinação do valor de α para inibição da EN pelo rCeEI-4.....	64
FIGURA 10: Determinação do valor de β para inibição da EN pelo rCeEI-4.....	65
FIGURA 11: Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise do MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan por EN e da constante de inibição da EN pelo rCeEI-5.....	66
FIGURA 12: Determinação do tipo de inibição da EN pelo rCeEI-5.....	67

FIGURA 13: Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos traduzidas do DNA do CeEI.....	69
FIGURA 14: O modelo da estrutura terciária e parte da estrutura primária do inibidor CeEI utilizados para delimitar os menores fragmentos ativos do inibidor.....	70
FIGURA 15: Géis de agarose (1%) dos fragmentos de DNA de CeEI, após digestão com enzimas de restrição.....	75
FIGURA 16: Purificação do fragmento 36 de CeEI expresso em bactérias.....	76
FIGURA 17: Purificação do fragmento 46 de CeEI expresso em bactérias.....	77
FIGURA 18: Purificação e caracterização do fragmento 46 de CeEI expresso em bactérias.....	78
FIGURA 19: Sequência de aminoácidos da porção N-terminal dos fragmentos 36 e 46.....	79
FIGURA 20: Purificação do fragmento 36 de CeEI expresso em leveduras.....	81
FIGURA 21: Curva de inibição de elastase de neutrófilo pelos fragmentos de CeEI.....	82
FIGURA 22: Quantidade de PMN no BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	84
FIGURA 23: Atividade do tipo MPO nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	86
FIGURA 24: Atividade do tipo ECA nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	87
FIGURA 25: Quantificação de cinina nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	88
FIGURA 26: Atividade inibitória sobre EN nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	89
FIGURA 27: Atividade do tipo MPO nos plasmas dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	91
FIGURA 28: Atividade do tipo ECA nos soros dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	92
FIGURA 29: Quantificação de cinina nos plasmas dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	93

FIGURA 30: Atividade do tipo MPO nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	94
FIGURA 31: Atividade do tipo EN nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	95
FIGURA 32: Atividade do tipo Cat G nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	96
FIGURA 33: Atividade do tipo ECA nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	97
FIGURA 34: Atividade do tipo HuPK nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	98
FIGURA 35: Quantificação de cinina nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	99
FIGURA 36: Atividade inibitória sobre EN nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	100
FIGURA 37: Determinação da quantidade de IL-6 nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	104
FIGURA 38: Determinação da quantidade de TNF- α nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	105
FIGURA 39: Determinação da quantidade de IL-6 nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	106
FIGURA 40: Determinação da quantidade de TNF- α nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	107
FIGURA 41: Identificação das células do epitélio alveolar do tipo II por anticorpo anti-proteína C associada a surfactante pulmonar.....	110
FIGURA 42: Proliferação das células pulmonares do tipo II tratadas com EN.....	111
FIGURA 43: Fragmentação de DNA das células pulmonares do tipo II tratadas com EN.....	112

Lista de Tabelas

TABELA I: Constantes de dissociação dos inibidores recombinantes para diferentes serinopeptidases.....	59
TABELA II: Dados biofísicos teóricos dos fragmentos de aminoácidos de CeEI.....	70
TABELA III: Atividades das diferentes peptidases encontradas nos materiais biológicos.....	100
TABELA IV: Resumo das atividades encontradas em comparação entre os grupos.....	101
TABELA V: Razão de TNF- α /IL-10 nos BAL e no pulmão dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.....	106

Lista de abreviaturas

Abz-Phe-Arg-Lys (Dnp)P-OH: o-aminobenzoil-fenilalanil-arginil-N-[2,4-dinitrofenil]etilenodiaminolisina

Abz-Thr-Pro-Phe-Ser-Gly-Gln-EDDnp: o-aminobenzoil-treonil-prolil-fenilalanil-serinil-glicil-glutaminil-N-[2,4-dinitrofenil]etilenodiamina

ACN: acetonitrila

AEBSF: fluoreto de aminoetilbenzenosulfonila

ATP: adenina trifosfato

BAL: lavado bronquealveolar

BK: bradicinina

BMGY: meio de cultura (do Inglês – *buffered minimum glycerol medium*)

BMMY: meio de cultura (do Inglês – *buffered minimum methanol medium*)

Boc-Gly-Gly-Leu-pNan: p-nitroanilida da butiloxycarbonil-glicil-glicil-leucina

Cat G: catepsina G

cDNA: DNA complementar

CeKI: inibidor de calicreína de sementes de *Caesalpinia echinata*

CL4FW: oligonucleotídeo *forward* da colônia 4

CL4RV: oligonucleotídeo *reverse* da colônia 4

CL5FW: oligonucleotídeo *forward* da colônia 5

CL5RV: oligonucleotídeo *reverse* da colônia 5

DMEM: meio de cultura (do Inglês – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP mix: mistura dos desoxirribonucleotídeos

DTT: 1,4-ditiotreitol

dTTP: desoxitirosina trifosfato

E. coli: *Escherichia coli*

E-64: trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano

EAB: tampão fosfato contendo ovoalbumina

ECA: enzima conversora de angiotensina

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

EI: complexo enzima inibidor

EN: elastase de neutrófilo

EP: elastase pancreática porcina

FPLC: cromatografia líquida rápida para proteína
HD-Pro-Phe-Arg-pNan: p-nitroanilida da D-prolil-fenilalanil-arginina
H-D-Val-Leu-Lys-pNan: p-nitroanilida da D-valil-leucil-lisina
HuPK calicreína plasmática humana
HPLC: cromatografia líquida de alta pressão
IL-10: interleucina 10
IL-6: interleucina 6
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
 k_{cat} : eficiência catalítica de uma reação enzimática
 K_i : constante de inibição (constante de dissociação do complexo enzima-inibidor)
 K_s : constante de dissociação do substrato
LB: meio de cultura *Luria-Bertani*
LPS: lipopolissacarídeo
MD: meio com dextrose mínima
MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC: aminometilcumarina da metoxicarbonil-succinil-alanil-alanil-prolil-valina
MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan: p-nitroanilida da metoxicarbonil-succinil-alanil-alanil-prolil-valina
MPO: mieloperoxidase
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR: reação em cadeia da polimerase
PEG: polietilenoglicol
pI: ponto isoelétrico
PMN: células polimorfonucleares
rCeEI: inibidor recombinante de elastase de *Caesalpinia echinata*
RNA: ácido ribonucleico
SBTI: inibidor de tripsina do feijão de soja
SDS: dodecilsulfato de sódio
SOC: meio de cultura Hanahan's Broth
Suc-Ala-Ala-Ala-pNan: p-nitroanilida da succinil-alanil-alanil-alanina
Suc-Phe-pNan: p-nitroanilida da succinil-fenilalanina
TAE: Tampão Tris/acetato contendo EDTA

TEMED: N-N-N'-N'-tetrametiletilenodiamina

TFA: ácido trifluoracético

TNF- α : fator de necrose tumoral α

TPCK: clorometilcetona da N^o-tosilfenilalanina

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

U: Unidade Internacional Enzimática - quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de produto por minuto

$V_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima de uma reação

YPD: meio de cultura (do Inglês – *yeast extract peptone dextrose*)

α : parâmetro de perturbação da K_s

β : parâmetro de perturbação da $V_{m\acute{a}x}$ (k_{cat}).

ϵ : coeficiente de extinção molar

Lista de aminoácidos

Nome	uma letra	três letras	Estrutura
Alanina	A	Ala	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Ácido aspártico	D	Asp	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$
Ácido glutâmico	E	Glu	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$
Arginina	R	Arg	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}^+ - \text{C} - \text{NH}_2 \end{array}$
Asparagina	N	Asn	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} - \text{NH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$
Cisteína	C	Cys	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$
Fenilalanina	F	Phe	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$
Glicina	G	Gly	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Glutamina	Q	Gln	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} - \text{NH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$
Histidina	H	His	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HN} \\ \\ \text{NH} \end{array}$

Nome	uma letra	três letras	Estrutura
Isoleucina	I	Ile	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Leucina	L	Leu	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array} $
Lisina	K	Lys	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ +\text{NH}_3 \end{array} $
Metionina	M	Met	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Prolina	P	Pro	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{COO}^- \end{array} $
Serina	S	Ser	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
Tirosina	Y	Tyr	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Treonina	T	Thr	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{HC} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Triptofano	W	Trp	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HN} - \text{C}_8\text{H}_6 \end{array} $
Valina	V	Val	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array} $

RESUMO

Elastase de neutrófilos (EN) e catepsina G (Cat G), importantes peptidases na defesa contra microrganismos, têm suas atividades rigorosamente controladas por inibidores endógenos; entretanto, quando ocorre algum desequilíbrio entre essas enzimas e seus inibidores podem ocasionar algumas doenças, como o edema pulmonar. Sabe-se que o tratamento do edema pulmonar com inibidores de EN pode resultar em uma diminuição da severidade da doença; mas, pouco se conhece sobre os inibidores de Cat G nesse processo, além disso, os inibidores disponíveis no mercado, possuem efeitos colaterais graves ou baixa eficiência, tornando justificada a busca por novos inibidores. Nosso laboratório vem, há algum tempo, purificando e caracterizando, clonando e expressando inibidores de peptidases contidos em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), como um inibidor de calicreína plasmática que também inibi Cat G (CeKI) e outro de EN e Cat G (CeEI). Sendo assim, seria interessante explorar a ação desses inibidores na fisiopatologia do edema pulmonar, para uma melhor compreensão da participação de cada uma dessas enzimas na patologia. Para isso, os objetivos desse trabalho foram expressar, purificar e caracterizar o CeEI recombinante, determinar o menor peptídeo ativo do inibidor e testá-los em um modelo animal *in vivo* de edema pulmonar, além de verificar o papel da EN em uma cultura de células epiteliais alveolares do tipo II. Após a clonagem do fragmento de cDNA (700 pb), obtiveram-se duas seqüências, com o mesmo sítio reativo (rCeEI-4 e rCeEI-5) que foram avaliados quanto à sua especificidade na hidrólise de substratos sintéticos. Embora a ação de ambos inibidores sobre EN seja enzimaticamente classificada como parcial mista, eles apresentaram afinidades diferentes com relação à Cat G. Para a obtenção do menor peptídeo ativo, com base na sequência primária e terciária do inibidor foram delimitados três possíveis fragmentos ativos, dois dos quais foram produzidos por Biologia Molecular e um sintetizado. Chegou-se à conclusão de que era necessária a seqüência completa do inibidor para sua melhor atividade e estabilidade. Para o modelo *in vivo* de edema pulmonar, soluções do CeKI, ou do rCeEI-4, em diferentes concentrações, foram injetadas na cauda de ratos Wistar. Em seguida, os animais receberam lipopolissacarídeo pela traquéia e, após seis horas, foram mortos, procedendo-se a sangria, lavagem broncoalveolar (BAL) e processamento do pulmão para análise. Nesse modelo *in vivo*, observou-se que os animais tratados com os dois inibidores apresentaram número de células polimorfonucleares diminuído no BAL. Tanto no BAL

quanto no sangue, o tratamento com inibidores diminuiu a concentração de cininas e no pulmão, observou-se uma diminuição da atividade de Cat G, entretanto só houve diminuição das atividades do tipo EN e de mieloperoxidase, quando os animais foram tratados com rCeEI. Em relação às citocinas, foi observado que somente o rCeEI foi capaz de aumentar as concentrações de interleucina 6. Isso indica que apesar de ambos inibidores serem capazes de diminuir o processo inflamatório agudo do pulmão, rCeEI agiu de uma forma mais efetiva. Para a cultura de células pulmonares do tipo II, foram utilizados ratos Wistar recém-nascidos e a identificação das células foi feita com anticorpo anti-proteína C associada a surfactante pulmonar. EN parece induzir a morte celular, do tipo apoptose, nessas células, aumentando a gravidade da doença.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Edema pulmonar

O edema pulmonar é uma doença com grande morbidade e mortalidade, resistente à maioria das terapias, estando associado a uma grande infiltração de neutrófilos no pulmão (Wiener-Kronish *et al.*, 1990). Esses liberam peptidases, como a elastase de neutrófilo humano (EN) e a catepsina G de neutrófilo humano (Cat G) que têm uma grande importância em doenças que comprometem esse órgão (Janoff, 1985). Uma vez não regulada, essas enzimas podem causar várias modificações estruturais que estão ligadas indiretamente à doença desse órgão.

No edema, o provável papel da EN e da Cat G seria o de aumentar a condutividade hídrica, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (Peterson *et al.*, 1995; Raats *et al.*, 2000); entretanto, acredita-se que os leucócitos polimorfonucleares (PMN), em especial os neutrófilos, e seus mediadores danifiquem o endotélio, permitindo a saída de líquido, provocando o edema (Cotran *et al.*, 1999).

Sabe-se que o extravasamento vascular de PMN ativados, em modelos animais, pode ser significativamente reduzido por inibidores de EN (Neuhof *et al.*, 1989 e 2003; Nishina *et al.*, 1997; Kishima *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 1999; Hagio *et al.*, 2001; Cruz-Silva *et al.*, 2010); nesses modelos, entretanto, pouco se sabe sobre a ação de inibidores de Cat G isoladamente. Esses resultados sugerem que o tratamento do edema com inibidores de EN poderia diminuir a severidade da doença, tornando esses inibidores um alvo terapêutico para o tratamento da enfermidade (Groeneveld, 2002; Neuhof *et al.*, 2003); entretanto, a aplicação clínica desses inibidores em pacientes com a Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA) ainda não é viável, devido a efeitos colaterais graves ou à baixa eficiência dos inibidores disponíveis no mercado, tornando justificada a busca por novos e mais potentes inibidores.

1.2 Enzimas e inibidores endógenos na inflamação

Os neutrófilos PMN circulantes são as primeiras células a chegarem aos sítios inflamatórios (Lungarella *et al.*, 2008), onde têm funções em dois processos distintos e complementares: uma na proteção contra microorganismos e outra no controle da inflamação por clivagem de produtos resultantes do processo inflamatório, facilitando assim sua remoção. Para tais funções, os PMN expressam e liberam algumas enzimas responsáveis pela degradação de proteínas extracelulares e inflamatórias do próprio

organismo e de proteínas de membrana de bactérias gram-negativas e fungos (Owen, Campbell, 1999; Korkmaz *et al.*, 2008). Apesar de parecer contraditório, a degradação da matriz extracelular é um acontecimento fundamental nos processos fisiológicos, para que ocorra o extravasamento vascular de PMN, bem como a sua penetração por barreiras teciduais, o remodelamento, a reparação e a cicatrização tecidual e nos processos de coagulação e de fibrinólise (Owen, Campbell, 1999). As enzimas dos PMN podem modular a sinalização celular pelo processamento de quimiocinas, modulando a rede de citocinas e ativando receptores específicos de superfície celular (Korkmaz *et al.*, 2008).

Nos grânulos citoplasmáticos, conhecidos como grânulos azurófilos ou primários dos PMN são armazenadas, em geral, serino, cisteíno, aspartil e metalopeptidases nas quais resíduos de Ser, Cys, Asp e grupos metálicos fazem parte dos sítios ativos das respectivas enzimas. Já na superfície dos grânulos, algumas serinopeptidases também podem ser expressas; dentre elas, duas enzimas da subfamília da quimotripsina, a EN e a Cat G que ficam preferencialmente ligadas à superfície externa da membrana plasmática (Owen *et al.*, 1995; Owen, Campbell, 1999; Korkmaz *et al.*, 2008). Essas peptidases também podem ser expressas em fagócitos mononucleares (Campbell *et al.*, 1989; Kargi *et al.*, 1990) e em algumas populações de eosinófilos (Davis *et al.*, 1984). Apesar de EN e Cat G apresentarem 37% de similaridade na seqüência primária, com um ancestral comum, oriundo da duplicação de um gene, serem as únicas serinopeptidases armazenadas na forma ativa nos PMN e apresentarem atividades similares, cada uma delas tem um comportamento específico (Korkmaz *et al.*, 2008).

A Cat G é sintetizada como uma proteína com 255 resíduos de aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de dezoito resíduos. Sua ativação ocorre pela hidrólise de um dipeptídeo tanto na parte N, como na C-terminal, sendo armazenada como uma peptidase ativa após a remoção do dipeptídeo da parte N-terminal (Salvesen *et al.*, 1987; Korkmaz *et al.*, 2005). Essa remoção é feita pela clivagem proteolítica da Cat G pela catepsina C, no resíduo Ile 16 da porção N-terminal da enzima madura (McGuire, Lipsky, 1993). A Cat G humana possui três isoformas, com diferentes conteúdos de carboidratos, num único sítio de ligação de carboidrato ligado à Asn. Ela é uma molécula extremamente básica com especificidade semelhante à quimotripsina e tripsina, já que é capaz de acomodar em P₁, tanto resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e volumosos, como Phe, Leu e Met, quanto resíduos positivos como Lys e

Arg, devido à presença de Glu no seu subsítio S₁; essa capacidade deve-se também à ausência de ponte de dissulfeto entre Cys 191 e Cys 220 o que melhora a flexibilidade e acomoda melhor o substrato (Korkmaz *et al.*, 2008). Apesar de não se ter certeza sobre os substratos naturais para Cat G, sabe-se que essa enzima reforça a atividade de EN na degradação da elastina, e também pode converter angiotensina I em angiotensina II (Laouar *et al.*, 1993; Owen, Campbell, 1999).

Elastases compreendem um grupo de serinopeptidases capazes de clivar uma importante proteína do tecido conectivo, a elastina, amplamente distribuída em tecidos de vertebrados como pulmões, artérias, pele e ligamentos (Werb *et al.*, 1982; Bieth, 1986), sendo as mais importantes a EN e a elastase pancreática (EP). A elastina não é o único, nem o mais importante substrato fisiológico (Bode *et al.*, 1989) dessas enzimas, que são capazes de clivar substratos onde o resíduo P₁ (Schechter; Berger, 1967) seja um aminoácido com uma cadeia lateral pequena (Bode *et al.*, 1989).

Estudos mostram que EN pode ter diferentes conformações ativas, dependendo do ambiente em que ela se encontre (Lestienne, Bieth, 1980). Ela é uma glicoproteína de 33 kDa que possui, como a Cat G, três isoformas diferentes entre si, pelas glicosilações em duas Asn, com uma única cadeia peptídica de 218 resíduos de aminoácidos e quatro pontes de dissulfeto (Bode *et al.*, 1989) e altamente catiônica, com um ponto isoelétrico extremamente básico. EN cliva, preferencialmente, ligações carboxi terminais de resíduos pequenos e hidrofóbicos, particularmente ligações de Val na posição P₁; sua seqüência de aminoácidos foi estabelecida por combinação de seqüências de peptídeos (Sinha *et al.*, 1987) e por métodos cristalográficos (Bode *et al.*, 1986); a estrutura tridimensional do complexo de EN e os inibidores sintéticos MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val clorometil cetona ou MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Ala clorometil cetona demonstrou que EN tem dois domínios de barril com seis fitas, típico de serinopeptidases semelhantes à quimotripsina. Apenas um segmento intermediário e o segmento C-terminal são organizados em α -hélice. Os resíduos do sítio ativo estão localizados entre os dois β -barris. A cadeia peptídica da EN é estabilizada pelas quatro pontes de dissulfeto e contém dois carboidratos ligados à Asn 109 e à Asn 159 (Korkmaz *et al.*, 2008).

A EN é considerada a principal peptidase responsável pelas funções dos PMN, sendo conhecida como uma das enzimas mais destrutivas do organismo, pois cliva proteínas da matriz extracelular, como fibronectinas, lamininas, colágenos e proteoglicanos, para a migração de neutrófilos, fatores da cascata da coagulação e do

complemento, além de clivar muitas peptidases e seus inibidores (Havemann, Gramse, 1984; Okada *et al.*, 1988). Essa enzima ainda tem um importante papel na regulação do processo inflamatório, já que ativa linfócitos e plaquetas, e induz a secreção de citocinas, entre outras funções (Travis, Salvesen, 1983; Bode *et al.*, 1989; Vaday, Líder, 2000; Bank, Ansorge, 2001). Além disso, a EN é considerada um poderoso defensor contra bactérias (Travis, Salvesen, 1983; Bode *et al.*, 1989).

A concentração de EN, nos PMN, excede a 5 mM, sendo que o total em uma única célula é estimado em mais de 3 pg (Liau, Campbell, 1995). Sob condições fisiológicas normais, essa alta concentração é rigorosamente controlada pela distribuição em diversos grânulos acidófilos (Bieth, 1986), após a estimulação dos PMN por algumas vias, como por agentes farmacológicos, fagocitose e exposição de células a imunocomplexos ou substratos opsonizados, a EN é rapidamente liberada dos neutrófilos para o meio extracelular, mas parte dela permanece ligada à membrana plasmática do neutrófilo (Owen *et al.*, 1995), sendo regulada por múltiplos inibidores endógenos.

Fisiologicamente, dentre as enzimas liberadas por PMN, as serino e as metalopeptidases são as mais ativas em pH neutro e as que exercem um papel majoritário na degradação de proteínas extracelulares; entretanto, a atividade proteolítica excessiva, prolongada ou inapropriada exerce um papel importante no processo de injúria que afeta virtualmente todos os órgãos do corpo. Sendo assim, a atividade dessas enzimas tem que ser estritamente regulada; por isso, é fácil entender porque seus inibidores, as serpinas, representam aproximadamente 10% de todas as proteínas plasmáticas. As principais serpinas plasmáticas, sintetizadas e secretadas pelos hepatócitos, são a α_1 -antipeptidase e o inibidor de peptidases conhecido como universal, a α_2 -macroglobulina (Owen, Campbell, 1999).

Já foi descrito que as células pulmonares do tipo II de ratos e as células humanas A549 também são capazes de sintetizar α_1 -antipeptidase, sugerindo sua produção local no pulmão (Boutten *et al.*, 1998). Além disso, alguns inibidores de serinopeptidases, como o inibidor de peptidase secretado por leucócitos e a elafina são sintetizados tecidualmente, sendo encontrados numa variedade de secreções glandulares, tais como trato respiratório superior e inferior, fluido seminal, muco cervical e fluido sinovial (Owen, Campbell, 1999). Sabe-se também que a EN, tanto livre quanto ligada à membrana, é o alvo preferencial de inibidores plasmáticos, em particular do seu inibidor majoritário a α_1 -antipeptidase, mas a EN também pode inativá-lo. Como

esses inibidores endógenos ligam-se preferencialmente à EN, a Cat G não é tão eficientemente controlada como a EN (Korkmaz *et al.*, 2005). Qualquer molécula de EN, que alcance a circulação, é rapidamente complexada com seus inibidores naturais a α_1 -antipeptidase e a α_2 -macroglobulina. Os complexos são retirados do plasma pelo fígado e/ou macrófagos e são degradados (Bode *et al.*, 1989).

Além disso, no tecido propriamente dito existem outros inibidores de serinopeptidases de neutrófilos, como a elafina e a SLPI (do inglês; Secretory Leucocyte Protease Inhibitor), essas proteínas também têm várias importantes funções tanto na homeostase quanto na inflamação, isso porque, regulam o funcionamento do sistema imune inato e a integração do sistema com a resposta adaptativa. Diferentemente da α_1 -antipeptidase e α_1 -antiquimotripsina, a elafina e a SLPI são sintetizadas e secretadas por células locais em resposta a IL, como TNF- α , por isso são conhecidas como inibidores de alarme (Williams *et al.*, 2006).

Elafina e SLPI são membros da família das quelonianinas e se caracterizam por dois domínios ricos em cisteína que são altamente homólogos e o domínio C-terminal que contem a atividade inibitória (Hiemstra, 2002). Apesar de muitas proteínas da família das quelonianinas terem sido identificadas em outros mamíferos, não foi encontrada elafina ortóloga em ratos ou camundongos (Moreau *et al.*, 2008).

SPLI humana é uma proteína catiônica não glicosilada de 11,7 kDa que contém 107 resíduos de aminoácidos e há presença da proteína autóloga em ratos, camundongos, porcos e ovelhas, sendo que citocinas antiinflamatórias, tais como IL-6 e IL-10 são capazes de induzir a produção de SLPI em macrófago. Apesar de SLPI ser inibidor de algumas enzimas, como EN, Cat G, trispina, quimotripsina, sua ação principal é a inibição sobre EN, já que apresenta uma baixa constante de dissociação e cinética de inibição favorável sobre essa enzima. SLPI parece ser constitutivamente expresso (Williams *et al.*, 2006), sendo que tem sido demonstrado que apenas 1/3 de SLPI em secreção brônquica está ativa. Além disso, SLPI é tido como a menor contribuição da inibição de EN nos alvéolos já que a α_1 -antipeptidase, a serpina que se liga preferencialmente a EN *in vivo*, difunde para o sangue para o alvéolo pela membrana alvéolo capilar e alcança uma concentração 3 vezes maior do que SLPI no alvéolo (Moreau *et al.*, 2008).

Elafina, por sua vez, é conhecida como antileucoprotease derivada da pele, é um inibidor de peptidase que é estruturalmente similar ao SLPI com parâmetros de expressão similares (Hiemstra, 2002). Seu gene codifica uma proteína para secreção

de 95 resíduos de aminoácidos. A produção de elafina é atribuída não só por células epiteliais brônquicas e epitélio alveolar, mas também por macrófagos alveolares. Também se sabe que EN é capaz de induzir um aumento de RNAm correspondente à elafina. É possível que haja um mecanismo de aumento da quantidade de inibidores ditos de alarme, como esses inibidores (SLPI e elafina) com a inibição do recrutamento de células inflamatórias, por diminuição do influxo de células inflamatórias no alvéolo (Williams *et al.*, 2006).

Há evidências substanciais de que os inibidores de peptidases confinam a atividade proteolítica dos PMN ao microambiente imediatamente pericelular, mas que eles não podem inibir a degradação de proteínas que estão em contato direto com a célula (Owen, Campbell 1999; Korkmaz *et al.*, 2008).

A proteólise no microambiente pericelular, a resistência das peptidases ligadas à membrana aos inibidores de altas massas moleculares e a estreita adesão de PMN a componentes da matriz, produzem uma área inacessível aos inibidores extracelulares (Korkmaz *et al.*, 2008). Além disso, as peptidases podem continuar ativas mesmo na presença dos inibidores, por meio de liberação de quantidades maciças por um grande número de células inflamatórias e/ou pela liberação de altas concentrações de peptidases de células individuais. Assim sendo, apesar de haver um controle estrito dessas peptidases pelos inibidores, elas são capazes de contornar esse bloqueio, levando ao desenvolvimento de algumas patologias, como nas doenças inflamatórias e, em especial, no edema (Owen, Campbell 1999; Korkmaz *et al.*, 2008).

No local da inflamação, a EN e a Cat G parecem permanecer ativas, devido a um desequilíbrio entre suas elevadas quantidades e a quantidade normal de inibidores endógenos de peptidases (Weiss, 1989; Morrison *et al.*, 1990; Kawabata *et al.*, 2000). Sugere-se que essas enzimas tenham um duplo papel nas inflamações, agindo tanto como enzima destrutiva quanto moduladora da resposta inflamatória, uma vez que muitas moléculas bioativas são seus substratos (Lungarella *et al.*, 2008). Além disso, nos sítios inflamatórios, o desequilíbrio pode ser resultante da deficiência ou falta de efetividade da α_1 -antipeptidase (Bode *et al.*, 1989; Kawabata *et al.*, 2002).

A EN e a Cat G estão relacionadas com enfisema pulmonar, SARA, fibrose, arteriosclerose (Henriksen, Sallenave, 2008), glomerulonefrite, artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias (Bode *et al.*, 1989). Alguns experimentos realizados em modelos animais demonstraram que o controle da atividade catalítica de EN, por meio de inibidores exógenos, é capaz de reduzir os sintomas do edema de pulmão

(Kawabata *et al.*, 2002; Neuhofer *et al.*, 2003; Araujo, Cruz-Silva, 2008; Cruz-Silva *et al.*, 2010); entretanto, o papel de Cat G ainda é pouco conhecido.

1.3 Interação de peptidases e citocinas na inflamação

A medida que haja um aumento das quantidades de peptidases liberadas pelos PMN são encontradas também citocinas pró-inflamatórias. A maior parte das citocinas contém numerosos sítios putativos de clivagem para EN e Cat G, sugerindo fortemente que eles possam representar substratos naturais para essas enzimas (Bank *et al.*, 1999, Bank; Ansorge, 2001). Estudos sobre interações das peptidases de PMN com citocinas focam predominantemente as citocinas inflamatórias, como o *Tumor Necrosis Factor* - α (TNF- α) e as interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) (Philippe *et al.*, 1992; Tsukada *et al.*, 1994; Bank *et al.*, 1995; Bank; Ansorge, 2001).

Sabe-se que nos sítios inflamatórios há concordância entre o aumento de peptidases liberadas por PMN e o aumento nos níveis de interleucinas, em especial de IL-6; logo, é bastante provável que essas enzimas influenciem a bioatividade das interleucinas.

Já foi demonstrado que IL-6 induz a liberação de serinopeptidases dos grânulos azurófilos dos neutrófilos (Bank *et al.*, 1995). Também já se sabe que EN e Cat G são capazes de inativar a IL-6, pela clivagem em diferentes ligações peptídicas dentro da molécula, resultando em pelo menos dois fragmentos, sem atividade citotóxica (Bank *et al.*, 1999, Bank; Ansorge, 2001). Sendo assim, sugeriu-se que a inativação de IL-6 pelas mesmas enzimas responsáveis pela sua liberação, pode representar um mecanismo de *feedback* negativo entre IL-6 e a ativação de PMN (Bank; Ansorge, 2001).

Outra importante citocina no desenvolvimento de doenças, como sepsis, é o TNF- α que é sensivelmente modulado pelas peptidases de PMN, já que inibidores dessas enzimas são capazes de inibir a secreção de TNF- α (Coeshott *et al.*, 1999). Além disso, IL-6 e TNF- α são capazes de induzir um pequeno aumento na síntese e secreção de α_1 -antipeptidase pelo fígado; mas isso não ocorre nas células pulmonares do tipo II de rato ou células pulmonares humanas (Boutten *et al.*, 1998).

A inativação combinada de IL-6 e TNF- α foi recentemente mostrada na prevenção da resposta inflamatória aguda, sendo que as presenças de EN e Cat G, tanto solúveis quanto ligadas à membrana, explicam esse fenômeno anti-inflamatório (Bank *et al.*, 1999; Bank; Ansorge, 2001).

1.4 Controle de peptidases

As enzimas podem ser controladas por diferentes modos, como no nível de expressão gênica, síntese e ativação de zimogênios, depuração hepática e, principalmente, por meio de seus inibidores específicos que funcionam frequentemente como pseudo-substratos, com diferentes graus de afinidade com o sítio ativo da enzima (Laskowski, Kato, 1980). Sabe-se que em algumas patologias, como enfisema pulmonar, artrite reumatóide, entre outras, há um descontrole da atividade das peptidases em relação a seus inibidores endógenos (Laskowski, Kato, 1980; Hiemstra, 2002). Um melhor entendimento na interação entre proteínas e inibidores pode oferecer novos conhecimentos para o desenho de inibidores sintéticos usados como drogas. Esses conhecimentos podem ser amplamente utilizados na Medicina, Agricultura e Biotecnologia (Rawlings *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, o estudo de interação entre enzimas e inibidores vem se aprimorando rapidamente, graças às técnicas da Biologia Molecular aliadas às ferramentas da Bioquímica (Taylor *et al.*, 1993). Com a utilização de mutação dirigida, houve grandes avanços no estudo químico e conformacional de proteínas; foi possível, por exemplo, a obtenção de peptídeos mais ou menos ativos e/ou específicos no caso de substratos para enzimas, e também a localização de aminoácidos importantes para a atividade da enzima, não só dentro, como fora do sítio ativo (Murooka, Ikeda, 1989; Rao *et al.*, 1989; Rokosz *et al.*, 1994; Oyama *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2002); desses estudos, também foi possível a obtenção de inibidores mais específicos e potentes para determinadas enzimas e, até mesmo, inibidores putativos (Shin *et al.*, 2005). Além disso, a clonagem possibilitou alguns estudos filogenéticos de inibidores, como a identificação e localização da divergência do ancestral comum, em diferentes espécies animais e vegetais (Rheaume *et al.*, 1994; Doyle, Luckow, 2003), bem como a fragmentação dos genes (Chen *et al.*, 1990; Botes *et al.*, 1991), sua composição em relação a partes do gene que codificam ou não as proteínas (exons e introns) e a identificação de famílias de multigenes (Borriello, Krauter, 1990).

Assim como as peptidases, seus inibidores são amplamente distribuídos em animais, plantas e microorganismos (Lawrence, Koundal, 2002), sendo classificados de acordo com o grupo de enzimas em que atuam. Dessa forma, existem os inibidores de serino, cisteíno, metalo, treonino e aspartilpeptidases e ainda os inibidores multifuncionais, ou seja, aqueles que são capazes de inibir diferentes classes de enzimas ao mesmo tempo (Richardson, 1977; Powers *et al.*, 2002). Em cada um

desses grupos, os inibidores são subdivididos em famílias e agrupados de acordo com a especificidade inibitória, a similaridade da estrutura primária, a massa molecular e a localização das pontes de dissulfeto em relação à posição do sítio reativo, uma pequena porção da molécula do inibidor, onde ocorre a ligação com a enzima (Laskowski, Kato, 1980; Richardson, 1991; Frokiaer *et al.*, 1994).

Em animais, os inibidores de serinopeptidases mais conhecidos são os das famílias das serpinas (do Inglês, *Serine Proteinase Inhibitor*), Kunitz e Kazal (Frokiaer *et al.*, 1994). Em plantas, destacam-se os inibidores de serinopeptidases das famílias Kunitz, Bowman-Birk, Abóbora, Batata I e Batata II (Laskowski, Kato, 1980; Richardson, 1991).

Os inibidores do tipo Kunitz de plantas são proteínas de 18 a 24 kDa, com 170 a 180 resíduos de aminoácidos, apresentando uma ou duas cadeias polipeptídicas e baixo conteúdo de resíduos de cisteína, usualmente de dois a quatro, que estão comprometidos na formação de uma ou duas pontes de dissulfeto (Richardson, 1991; Mello *et al.*, 2006); apresentam um sítio reativo cuja posição dos resíduos participantes freqüentemente é homóloga entre seus membros (Richardson, 1991).

O primeiro inibidor de planta, bem caracterizado, foi um da família Kunitz, o inibidor de tripsina de feijão de soja; sua purificação e cristalização, bem como a do complexo com a tripsina, constituem uma das realizações mais importantes da “Bioquímica dos Inibidores” (Laskowski, Kato, 1980).

Todos os membros das famílias de inibidores de serinopeptidases de plantas apresentam genes geralmente pequenos; a região do DNA que codifica esses inibidores não apresenta introns (Boulter, 1993), sendo muitos desses inibidores produtos de famílias de multigenes (Ryan, 1990). Os inibidores canônicos do tipo Kunitz apresentam estruturas que obedecem a um padrão, onde a ligação do sítio reativo é envolvida por uma alça responsável pela não dissociação das duas cadeias peptídicas, durante a conversão do inibidor não ligado para o inibidor ligado à enzima; entretanto, algumas interações fortes e não covalentes, como interação hidrofóbica e iônica, podem substituir as pontes de dissulfeto – **FIGURA A** (Bode, Huber, 1992; Krowarsch *et al.*, 2003). Em cada família, com algumas exceções como na família Batata II, a posição de todas as pontes de dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas são conservadas. Alguns inibidores e outras proteínas similares possuem ainda pontes de dissulfetos intercadeias, como a testudina e a β_1 -bungarotoxina (Laskowski, Kato, 1980; Rawlings *et al.*, 2004).

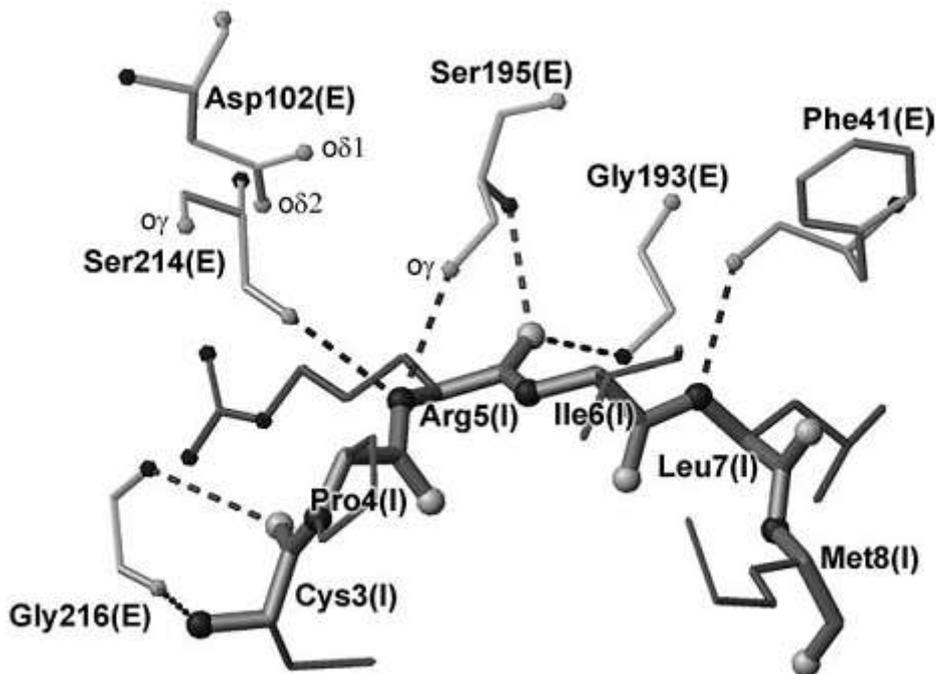


FIGURA A: Representação esquemática de inibição baseada na estrutura do complexo inibidor de tripsina de *Cucurbita maxima* (I) e a tripsina (E) (Krowarsch *et al.*, 2003).

A inibição das serinopeptidases ocorre, geralmente, pelo estabelecimento de uma forte e altamente específica ligação entre o inibidor e a enzima, e que está restrita ao sítio reativo, principal região da molécula responsável por sua especificidade inibitória (Creighton, Darby, 1989; Otlewski *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação dos inibidores tem sido intensamente investigado (McPhalen, James, 1987; Greenblatt *et al.*, 1989). O conhecimento do mecanismo de ação de peptidases e sua regulação *in vitro* e *in vivo* em animais, plantas, microorganismos e vírus contribuem para o entendimento das funções das peptidases em algumas alterações fisiológicas e em algumas patologias (DeClerck, Imren, 1994; Hayashi *et al.*, 1994; Kennedy, 1998), podendo servir para futuras aplicações práticas dos inibidores não só na Medicina, mas também na Agricultura (Lawrence, Koundal, 2002; Mello *et al.*, 2006).

Os inibidores de peptidases têm sido usados em modelos animais de epilepsia (Gatti *et al.*, 2000), doenças coronarianas (Kim *et al.*, 1998; Borer, 2004), processos inflamatórios (Neuhof *et al.*, 2003; Lopes-Ferreira *et al.*, 2004; Malavazi-Piza *et al.*, 2004), em patologias relacionadas à cascata da coagulação (Butenas *et al.*, 2000), na

resposta imune (Andreotti *et al.*, 2002), entre outros. Na Medicina, inibidores de peptidases já são usados como medicamento para o tratamento de algumas doenças relacionadas a distúrbios da cascata da coagulação (Golino *et al.*, 2004; Turecek *et al.*, 2004). Além de testes *in vitro* (Cruz-Silva *et al.*, 2004), vários testes *in vivo* (Nesheim, 2003; Price *et al.*, 2004; Kurata, Horii, 2004) têm sido feitos com o intuito de melhorar os medicamentos já utilizados e abranger o maior número de doenças.

1.5 Peptidases e inibidores extraídos de plantas

A função das serinopeptidases em plantas ainda é objeto de estudo; diferentemente das serinopeptidases de animais, as de plantas, possivelmente, não sejam usadas em processos envolvendo digestão de proteínas (Lawrence, Koundal, 2002). Em relação aos seus inibidores, talvez o principal papel seja o de defesa contra predadores (Schuler *et al.*, 1998; Valueva, Mosolov, 1999; Lawrence, Koundal, 2002); mas, também se acredita que os inibidores de plantas representem uma forma de armazenamento e mobilização de proteínas (Valueva, Mosolov, 1999). Além disso, Planchais e colaboradores (2000) utilizaram inibidores de peptidases para impedir o processo da mitose em plantas de tabaco e, assim, estudar os eventos bioquímicos envolvidos no ciclo celular.

De um modo geral, as proteínas (peptidases e inibidores) são abundantes em sementes de leguminosas, tubérculos e cereais (Richardson, 1991; Lawrence, Koundal, 2002; Cruz-Silva *et al.*, 2004). A maior parte dos estudos feitos com inibidores de peptidases no reino vegetal é originária das três principais famílias: *Leguminosae*, *Solanaceae* e *Gramineae* (Richardson, 1991; Mello *et al.*, 2006).

Da ordem das Fabales, a família *Leguminosae*, também conhecida por *Fabaceae*, é uma das três maiores famílias de plantas, possuindo 650 gêneros e mais de 18.000 espécies. É a família com maior importância econômica, pois nela se encontram plantas ornamentais, medicinais, as que fornecem importantes substâncias como pigmentos, resinas, cola, entre outros e, principalmente, as de valor nutricional para o homem e outros animais, como grãos e cereais (Doyle, Luckow, 2003). Sendo vista como uma ampla família e muito distinta, é tradicionalmente dividida em três subfamílias de tamanhos e aspectos morfológicos diferentes: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* (Doyle, Luckow, 2003).

A subfamília *Caesalpinioideae* é a representante da maior diversidade de árvores tropicais, possuindo 162 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies (Doyle; Luckow,

2003). São plantas subarbustivas, arbustivas, arbóreas ou trepadeiras das matas; raramente ervas, suas folhas são compostas e, em geral, pinadas; ocorrem principalmente em climas tropicais e subtropicais. Um dos membros dessa subfamília é a *Caesalpinia echinata*, também conhecida como pau-brasil, ibirapitanga, pau-rosado, pau-de-Pernambuco ou ibirapitã (**FIGURA B**), que é classificada oficialmente pelo IBAMA como ameaçada de extinção.

A *C. echinata* é caracterizada pela cor castanho-avermelhada escura de seu tronco e ocorre em quase todas as matas do país como na Mata Atlântica, que se estende desde o sul da Bahia até o sul de Santa Catarina, aparecendo também nas matas de planalto do interior, capoeiras velhas e cerrados (Cardoso *et al.*, 1998). Durante muitos anos, a *C. echinata* foi devastada devido à extração de pigmentos de seu tronco para tintura de tecidos, além de confecção de móveis, objetos para decoração e material para construção. Hoje, a importância econômica do pau-brasil se resume à produção de arcos de violino (Cardoso *et al.*, 1998), com madeira de árvores de cultivo direcionado. Apesar de ter dado origem ao nome do nosso país e constituir sua primeira importância econômica, pouco se conhece sobre a Bioquímica e Fisiologia dessa importante árvore.



FIGURA B: *Caesalpinia echinata* (pau-brasil).

No Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo têm sido purificados e caracterizados muitos inibidores de serinopeptidases de origem vegetal (Sampaio *et al.*, 1992; Batista *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 2000). Das sementes de *C. echinata*, nosso grupo já purificou um inibidor de tripsina (Oliveira *et al.*, 2002) e de fator XIIa, fator Xa, plasmina e calicreína plasmática humana - CeKI (Cruz-Silva *et al.*, 2004). O CeKI também é capaz de inibir Cat G, mas não a EN. Também já purificamos, caracterizamos e clonamos o fragmento do gene de um inibidor de Cat G e EN (CeEI), a partir dessas sementes (Cruz-Silva *et al.*, 2005), sendo a ação desses inibidores testada tanto na hidrólise de substrato sintéticos, como em modelos animais. Em um modelo, em pulmão isolado de coelho, a formação do edema pulmonar foi retardada pelo CeKI, mas completamente abolida pelo CeEI (Cruz-Silva *et al.*, 2010).

Os primeiros resultados nos deram bases para, nesse trabalho, nos dedicarmos a uma melhor compreensão não só da ação dos inibidores, mas também da fisiopatologia do edema pulmonar. Além disso, é válido ressaltar que tais estudos acrescentariam o conhecimento da participação da EN e da Cat G na patologia, uma vez que o CeKI e o CeEI apresentam afinidades diferentes para cada uma dessas enzimas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi estudar alguns eventos envolvidos no mecanismo molecular do edema pulmonar induzido por lipopolissacarídeo em ratos, usando inibidores de peptidases de sementes de pau-brasil e seus recombinantes; para isso, os objetivos específicos foram:

1. Expressar, purificar e caracterizar dois diferentes inibidores de elastase recombinantes, a partir de sementes de *Caesalpinia echinata*;
2. Subclonar o fragmento de DNA correspondente ao sítio reativo do inibidor, e expressar, purificar e caracterizar a proteína recombinante resultante;
3. Padronizar uma linhagem de células pulmonares e avaliar o efeito da elastase de neutrófilo (EN) na cultura;

4. Estabelecer um modelo de edema pulmonar em ratos e verificar o efeito de inibidores de EN e/ou catepsina G nesse modelo.

3. MATERIAL

Animais: ratos Wistar foram obtidos no Biotério do Instituto Nacional de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR), sendo que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP 1161/06).

Colunas: HiTrap Q-FF, Sepharose G-75, Superdex G-30, Ni-Sepharose e PD-10 foram comercialmente adquiridas da G.E. HealthCare (Piscataway, NJ, EUA). Coluna de fase reversa C₁₈ foi obtida da Phenomenex (Torrance, CA, EUA).

Substratos cromogênicos e fluorogênicos: H-D-Pro-Phe-Arg-pNan foi obtido da Chromogenix (Milão, Itália), Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNan, Boc-Gly-Gly-Leu-pNan, MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC e MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), Suc-Ala-Ala-Ala-pNan e H-D-Val-Leu-Lys-pNan da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e Suc-Phe-pNan da Bachem Biochemical GmbH (Heidelberg, Alemanha). Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Thr-Pro-Phe-Ser-Gly-Gln-EDDnp foram sintetizados e gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria Aparecida Juliano do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.

Enzimas: Elastase pancreática porcina (EP), calicreína tecidual renal humana, calicreína plasmática humana (HuPK) e elastase de neutrófilo (EN) humano foram adquiridas da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), catepsina G de neutrófilo humano, quimotripsina e tripsina pancreáticas bovinas da G.E. HealthCare (Piscataway, NJ, EUA), subtilisina A da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq polimerase) e enzimas de restrição de *Xanthomonas holcicola* (Xho I) e de *Bacillus amyloliquefaciens* (BamHI) da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), enzimas de restrição SnaB I de *Sphaerotilus natans*, Sal I de *Streptomyces albus* G e Avr II de *Anabaena variabilis* da Fermentas (Burlington, Ontário, Canadá) e transcriptase reversa, RNase e T₄ DNA ligase da Promega (Madison, WI, EUA)

Inibidores: Fluoreto de aminoetilbenzenosulfonila (AEBSF), trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano (E-64), *Soybean Trypsin Inhibitor* (SBTI) e aprotinina foram adquiridos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), clorometilcetona da N^α-tosilfenilalanina (TPCK), o-fenantrolina e lisinopril da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) da Quimibrás Indústria Química S.A. (Rio de Janeiro, Brasil) e azida de sódio da Fisher Scientific Company (Fair Lawn, NJ, EUA). CeKI foi purificado em nosso laboratório, de sementes de *C. echinata* (Cruz-Silva *et al.*, 2004). Fragmento 55 do inibidor CeEI foi sintetizado e cedido pelo Prof. Dr. Clóvis R. Nakaie, do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

Padrões para eletroforese: padrão de pares de bases *DNA marker ladder 100 pb* foi adquirido da G.E. HealthCare (Piscataway, NJ, EUA), padrão de massa molecular *Protein Marker Broad Rang* da New England BioLabs, Inc. (Ipswich, MA, EUA), *Broad Range Markers sc-2361* da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EUA) e *Kaleidoscope Prestained Standards* da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA).

Antibióticos: penicilina, estreptomicina, ampicilina, canamicina, tetraciclina e cloranfenicol foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA).

Reagentes para meio de cultura de bactérias e leveduras: nome por extenso *Luria-Bertani* (LB) e *Yeast extract/peptone/dextrose medium* (YPD) foram adquiridos da USB Corporation (Cleveland, OH, EUA), ágar e peptona foram obtidos da BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, EUA) e o isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG) da Fermentas (Burlington, Ontário, Canadá). *Buffered minimum glycerol medium* (BMGY) e *buffered minimum methanol medium* (BMMY).

Soluções para cultura de células pulmonares: tripsina/EDTA, soro fetal bovino e o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) e Histopaque 1,077 da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA).

Anticorpo: anticorpo anti-proteína C associada à surfactante pulmonar e anticorpo secundário (anti-coelho conjugado com Cy3) foram adquiridos da Abcam plc (Cambridge, Reino Unido). Anticorpo anti-BK foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Kazuaki Shimamoto do II Department of Internal Medicine - Sapporo Medical University, Sapporo, Japão.

Plasmídeos: pGEM[®]-T *easy* foi obtido da Promega (Madison, WI, EUA) – seqüência na Figura C; pET-14b e pET-26b foram obtidos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) – seqüência na Figura D e E, respectivamente e pPIC9K foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) – seqüência na Figura F.

Cepas de bactérias:

E. coli cepa TG1 - características relevantes: F[']traD36 lacI^qΔ(lacZ) M15 proA⁺B⁺ /supE Δ(hsdM-mcrB)5 (r_k - m_k - McrB⁻) thi Δ(lac-proAB).

E. coli cepa BL21-SI - características relevantes: [F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻) gal dcm endA1 1on proUp::T7 RNAP::malQ-lacZ Tet^S]

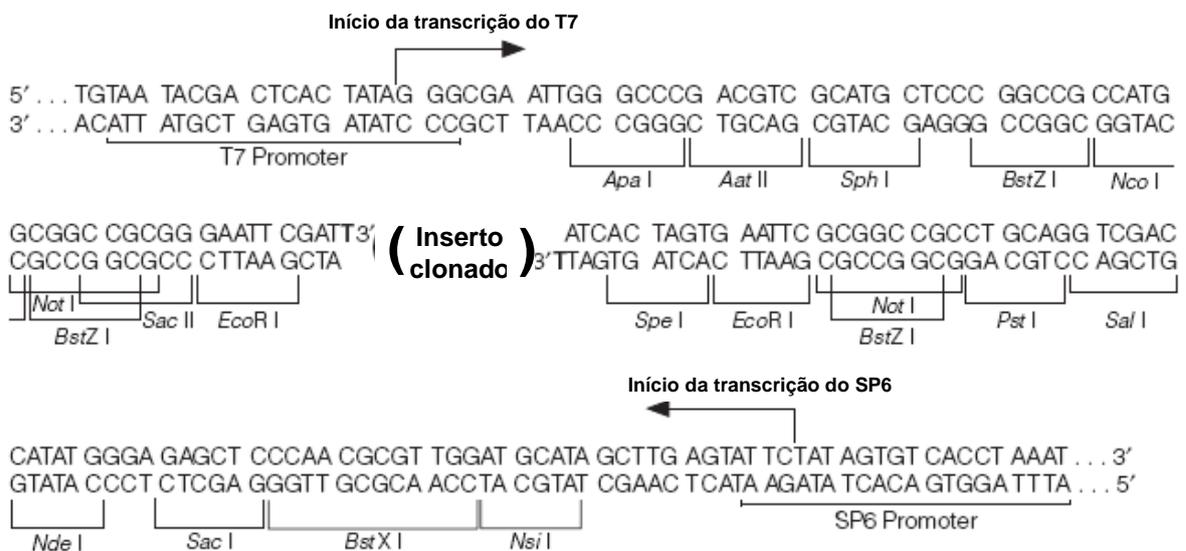
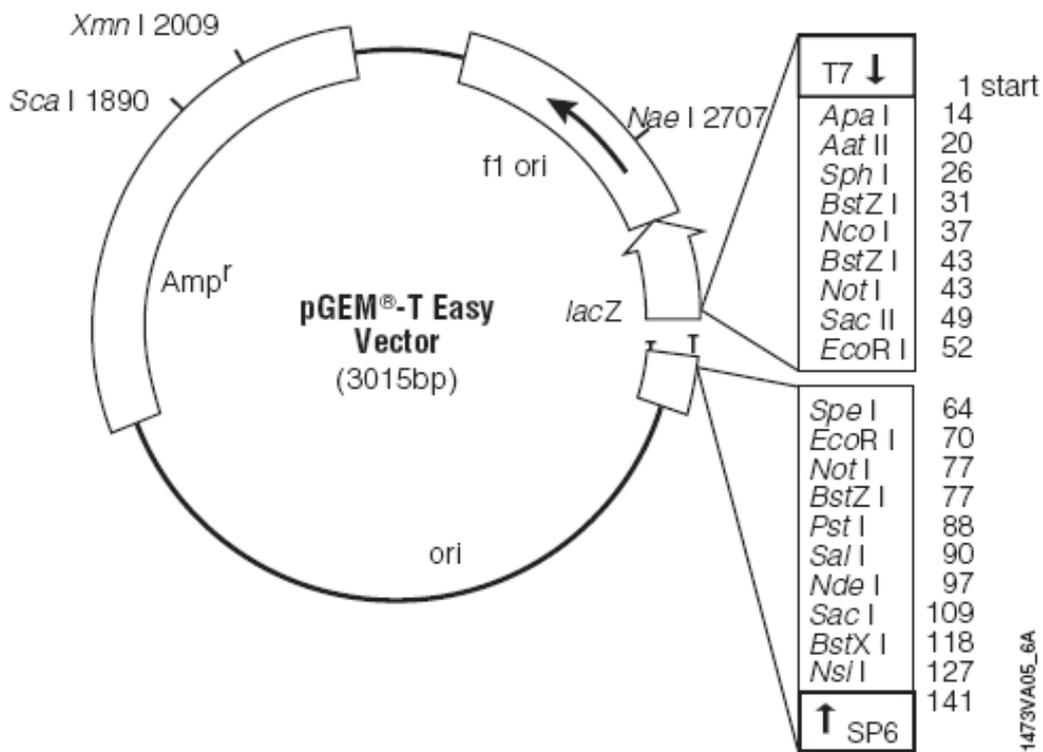
E. coli cepa Rosetta Gami - características relevantes: [F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan pRARE (Cm^R)]

Pichia pastoris cepa GS115 - características relevantes: HIS4.

Kits: Kits de detecção de interleucinas *Quantikine immunoassay* (IL-6, IL-10 e TNF-α) foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), *Bio-Rad Protein assay*, para dosagem de proteína, da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA), *QIAEX II gel extraction* e *QIAGEN[®] Plasmid Midi kit* da QIAGEN (Hilden, Alemanha), *pGEM[®]-T Easy Vector System I* da Promega (Madison, WI, USA) e *DYEnamic[™] ET* da G.E. HealthCare (Piscataway, NJ, USA).

Outros reagentes: Bis-acrilamida, Tween 20, Triton X, lipopolissacarídeo, carragenina Kappa, iodeto de propídio e *o*-dianisidina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA), acrilamida da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA), N-N-N'-N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), Na¹²⁵I da Perkin Elmer In. (Waltham, MA, EUA), albumina sérica bovina, albumina de ovo, γ -globulina e ácido trifluoracético da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), estaurosporina da Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido), acetonitrila da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Azul de trypan foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

Os demais reagentes, usados nas diferentes etapas do trabalho, foram também os da melhor procedência possível.



REGIÃO DE CLONAGEM DO pGEM®-T easy

FIGURA C: Mapa do plasmídeo de clonagem *pGEM[®]-T easy* e seqüência de nucleotídeos com os sítios de restrição da região de clonagem.

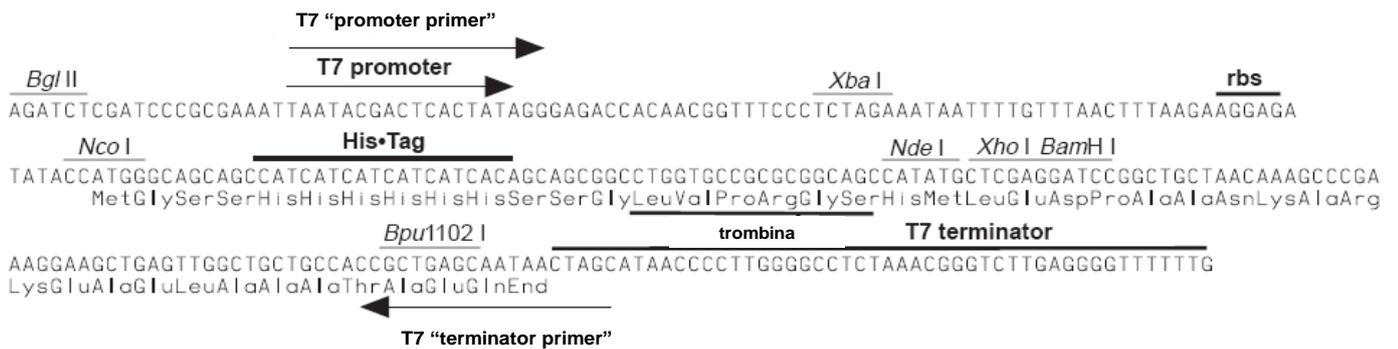
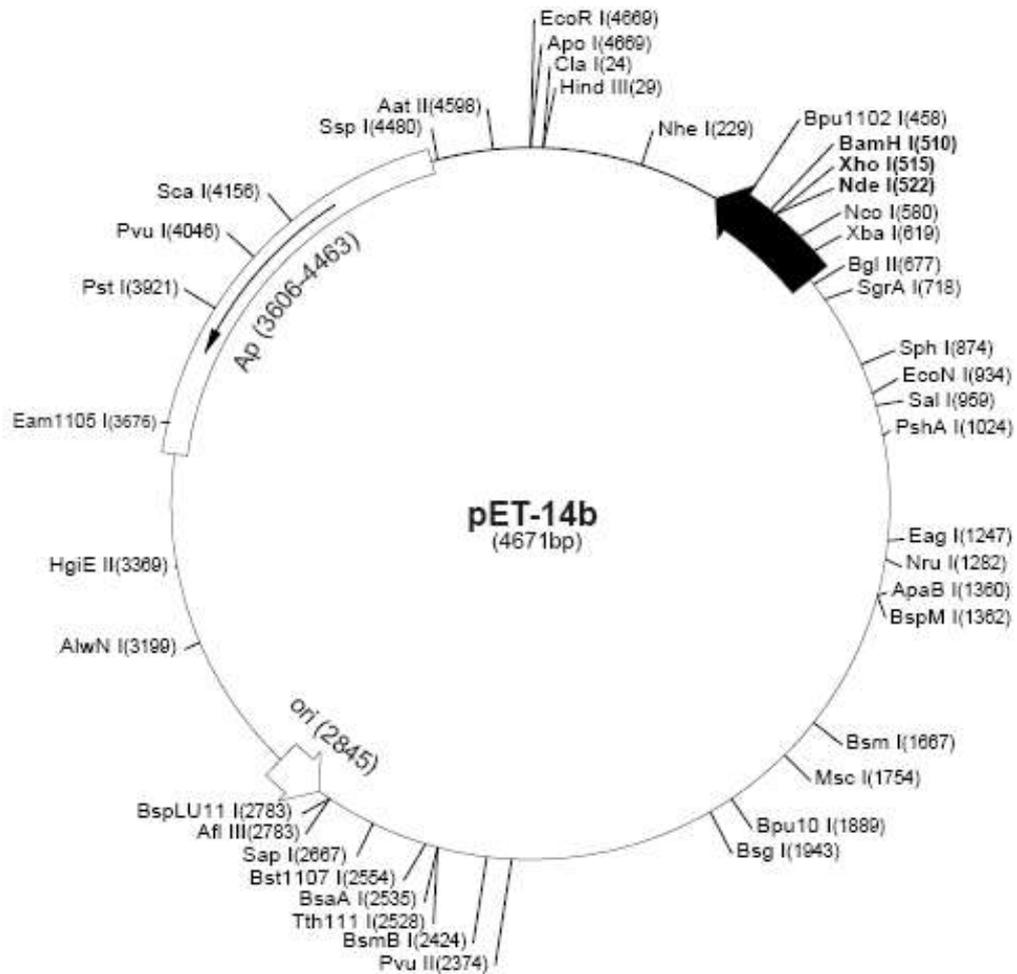


FIGURA D: Mapa do plasmídeo de expressão pET-14b e sequência de nucleotídeos com os sítios de restrição da região de clonagem. O vetor pET-14b possui uma sequência de nucleotídeos que codifica seis resíduos de His fusionadas à proteína de interesse (*His•Tag*[®]); a cauda de His pode ser retirada da proteína de interesse por clivagem com trombina, via um sítio específico para essa enzima que se encontra entre a cauda de His e a proteína.

FIGURA E: Mapa do plasmídeo de expressão pET-26b e sequência de nucleotídeos com os sítios de restrição da região de clonagem. O vetor pET-26b possui a sequência que codifica o peptídeo sinal *pelB* em fase com a sequência da proteína de interesse, o que direciona a proteína de interesse para o espaço periplasma, além de uma cauda de histidina *His•Tag®* na região C-terminal da proteína.

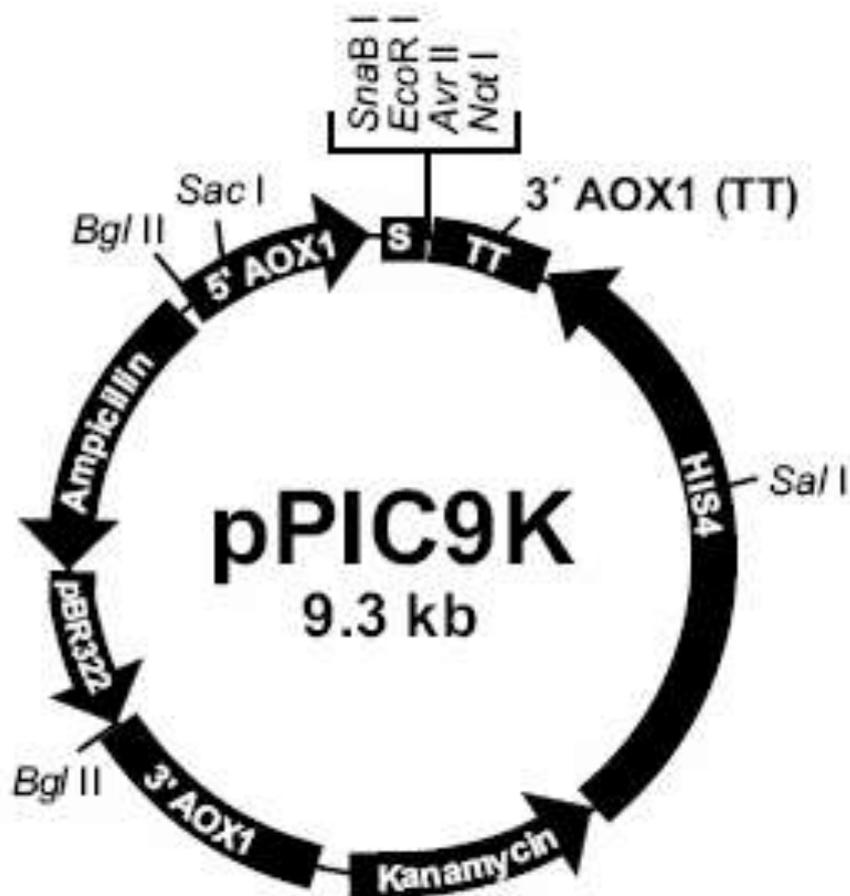




FIGURA F: Mapa do plasmídeo de expressão pPIC9K para leveduras *Pichia pastoris* e eventos de integração do plasmídeo ao genoma da levedura.

4. MÉTODOS

Anteriormente, o fragmento do gene do inibidor CeEI havia sido identificado e clonado em vetor pGEM[®]-T Easy. Foram obtidas duas seqüências de nucleotídeos para inibidores de peptidases; as seqüências de aminoácidos traduzidas demonstraram algumas diferenças de aminoácidos entre os dois clones; apesar disso, quando as seqüências foram alinhadas pelo programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), ambas apresentavam alta similaridade (99,4%) com as seqüências das proteínas Mpc 20 e *Glycine max*. As seqüências de nucleotídeos e de resíduos de aminoácidos dos clones 4 e 5 apresentaram identidade com inibidores de peptidases da família do tipo Kunitz de SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor) de 64-67% e 45-49%, respectivamente.

Para a expressão do CeEI, uma construção em vetor pET-14b foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* da cepa BL21(trxB)pLys; porém, não houve expressão dos CeEIs recombinantes. Por isso, o processo foi repetido com *E. coli* da cepa Rosetta gami, descrito neste trabalho.

4.1 Métodos de Biologia Molecular

4.1.1 Eletroforese em gel de agarose

A separação de fragmentos de DNA foi feita em gel de agarose. A agarose foi dissolvida em tampão Tris 40 mM e acetato 20 mM contendo EDTA 2 mM por aquecimento brando (em forno de microondas). Após o resfriamento dessa mistura, brometo de etídeo 0,5 µg/ml foi adicionado e a mistura foi colocada em uma forma para a solidificação do gel. A amostra de DNA (50 µl) foi aplicada no gel que foi submetido a uma corrente elétrica de 4-10 V/cm, em tampão de corrida TAE. A corrida foi acompanhada com corante (bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol 30%) na proporção amostra/corante de 10:1 (V/V).

Os géis foram fotografados e os tamanhos dos fragmentos de DNA foram determinados pela comparação de sua mobilidade eletroforética com a de um padrão de fragmentos de DNA com pares de bases conhecidos.

4.1.2 Purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose

Os fragmentos de DNA de interesse foram purificados do gel de agarose, utilizando-se o kit *QIAEX II gel extraction*. Para isso, a banda com o tamanho esperado

foi recortada do gel, com o auxílio de um estilete estéril, e dissolvida em três volumes do tampão QX1 e 10 µl de solução QIAEX II. A mistura foi incubada por 10 min a 50°C, sendo agitada a cada 2 min e, em seguida, foi submetida a uma centrifugação a 4000xg por 30 s. O *pellet* foi lavado duas vezes com 500 µl do tampão QX1 e mais duas vezes com 500 µl do tampão PE, para a completa remoção dos sais. Depois de lavado, o material foi seco, por aproximadamente 15 min à temperatura ambiente e, em seguida, dissolvido em 20 µl de H₂O estéril.

4.1.3 Precipitação do DNA por etanol

A precipitação do DNA por etanol foi utilizada para concentrar o DNA e também para a remoção de sais. Para isso, foram adicionados à solução de DNA 0,1 vezes o volume de tampão acetato 0,3 M pH 5,2 e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto. Após centrifugação a 12000xg por 30 min, o *pellet* obtido foi lavado com três volumes de etanol 70% para remoção de sais do DNA. O *pellet* de DNA foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em H₂O estéril.

4.1.4 Quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria

O método espectrofotométrico de quantificação de DNA e RNA é comumente usado para a determinação de suas concentrações e graus de pureza relativa.

A quantificação de DNA ou RNA foi realizada pela leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A absorvância em 260 nm permite calcular a concentração de ácidos nucleicos nas amostras. Para a conversão de absorvância em concentração de DNA ou RNA foi considerada que uma unidade de absorvância corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de DNA fita dupla e 40 µg/ml para DNA fita simples ou RNA. A relação entre as leituras nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm (260/280) foi utilizada para estimar o grau de pureza das preparações de DNA e RNA.

4.1.5 Seqüenciamento automático de DNA

O seqüenciamento automático foi realizado no *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se o kit *DYEnamicTM ET*.

Ao tubo da reação, adicionaram-se 300 ng de DNA molde, 3,2 pmol de oligonucleotídeo iniciador, 4,0 µl de tampão acetato 1,5 M pH 5,2, contendo EDTA 250

mM e 4 µl do *DYEnamicTM ET*, em um volume final de 10 µl. As condições da reação foram:

Passo	Temperatura (°C)	Tempo
1 - desnaturação	94	5 min
2 - desnaturação	94	40 s
3 - anelamento	50	40 s
4 - polimerização	72	100 s
5 - polimerização	72	5 min

Os passos 2, 3 e 4 foram repetidos 25 vezes.

4.2 Expressão dos CeEIs recombinantes

4.2.1 Preparação de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa Rosetta Gami competentes para choque térmico

Uma colônia isolada de *E. coli*, recém-crescida em meio de cultura *Luria-Bertani* LB-ágar, foi inoculada em 2,0 ml de meio LB contendo cloranfenicol (34 µg/ml) canamicina (15 µg/ml) e tetraciclina (12 µg/ml) e incubada por aproximadamente 12 h a 37°C, sob agitação. A cultura foi então inoculada em 250 ml de meio LB, contendo os antibióticos citados acima, até atingir leituras de absorbância em 550 nm entre 0,350 e 0,600. A cultura foi mantida em banho de gelo por 60 min e depois centrifugada a 3000xg por 15 min a 4°C. O *pellet* obtido foi suspenso em 80 ml de tampão acetato 10 mM pH 5,7, contendo KCl 100 mM, CaCl₂ 50 mM e glicerol 10%, e mantido por 60 min em banho de gelo. O material foi novamente centrifugado e as bactérias competentes foram suspensas em 20 ml do tampão descrito acima. Em seguida, foram separadas alíquotas de 200 µl para estocagem a -70°C.

4.2.2 Transformação de bactérias competentes *E. coli* cepa Rosetta Gami por choque térmico

Para a transformação, foram incubados 5 µl de DNA plasmidial contendo o gene de CeEI, com 200 µl de bactérias competentes, por 30 min em banho de gelo. Em seguida, as bactérias foram submetidas ao choque térmico (42°C) por 90 s, sendo imediatamente colocadas por 3 min em banho de gelo. À continuação, foram adicionados 800 µl de meio de cultura Hanahan's Broth (SOC) às bactérias transformadas e a mistura foi incubada por 1 h a 37°C, sob agitação (180 rpm). Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido (LB/ágar), contendo

ampicilina (200 µg/ml), canamicina (15 µg/ml), tetraciclina (12 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml) e incubadas por 12 h a 37°C.

4.2.3 Análise das colônias de *E. coli* transformadas

Colônias de bactérias transformadas isoladas foram escolhidas aleatoriamente para análise da presença do plasmídeo recombinante, contendo o inserto de DNA de interesse pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou por minipreparações de DNA plasmidiais e análise com enzimas de restrição.

4.2.4 Expressão dos CeEI recombinantes em escala analítica

Primeiramente, os clones positivos foram cultivados em escala analítica para a confirmação da expressão do CeEI recombinante, após a indução com IPTG (1,0 mM). Algumas colônias de bactérias *E. coli* cepa Rosetta Gami, transformadas com o plasmídeo pET-14b contendo os fragmentos de cDNA de CeEI, foram inoculadas em 3 ml de meio LB contendo os antibióticos ampicilina (200 µg/ml), canamicina (15 µg/ml), tetraciclina (12 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml), e foram incubadas por aproximadamente 24 h a 37°C, sob agitação (180 rpm); esse período foi suficiente para a absorbância da solução em 550 nm atingir o valor de 0,600, lida em leitora de placas Synergy HT (BioTek, Winooski, EUA). O crescimento das bactérias foi acompanhado por uma curva de $A_{550nm} \times \text{tempo (h)}$, e quando essa curva atingiu a fase exponencial, as culturas foram divididas em três alíquotas: 1,0 ml foi mantido em estoque a -70°C, 1,5 ml foram utilizados para confirmação da síntese protéica, induzida pela adição de IPTG (1 mM) e 1,5 ml restantes foram utilizados como controle do nível de expressão basal. As alíquotas equivalentes às culturas induzidas e não induzidas foram mantidas por 12 h a 37°C, sob agitação (180 rpm).

4.2.5 Extração e análise de proteínas do lisado total de bactérias

As culturas de bactérias, induzidas ou não, foram divididas em duas partes iguais e submetidas à centrifugação de 6000xg por 3 min para obtenção dos *pellets* celulares. Uma parte deles foi suspensa em 200 µl de tampão de amostra de eletroforese e aquecida por 10 min a 100°C para se obter o lisado celular total. As suspensões foram novamente centrifugadas, e o sobrenadante foi utilizado para análise da proteína recombinante por SDS-PAGE. A outra parte dos *pellets* foi suspensa em tampão Tris 50 mM pH 8,0, aquecida a 37°C e, em seguida, congelada

em gelo seco, para a lise das bactérias sem desnaturar as proteínas. Esse material foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para teste da atividade inibitória sobre a ação da EN na hidrólise do substrato cromogênico MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan.

4.2.6 Expressão dos CeEI recombinantes em escala preparativa

Uma das colônias de bactérias *E. coli* cepa Rosetta Gami que apresentou maior nível de expressão do CeEI recombinante foi empregada para a expressão em escala preparativa.

A colônia de bactérias foi inoculada em 10 ml de meio LB contendo ampicilina (200 µg/ml), canamicina (15 µg/ml), tetraciclina (12 µg/ml) e cloranfenicol (54 µg/ml) e incubada por 24 h a 37°C, sob agitação constante (180 rpm). A cultura foi adicionada a 1 l do mesmo meio e incubada nas mesmas condições anteriores até atingir 0,700 de absorbância em 600 nm, acompanhada na leitora de placas. Em seguida, IPTG (1,0 mM) foi adicionado à cultura, para a indução da expressão de CeEI. A cultura foi mantida por 20 h a 37°C, sob agitação constante (180 rpm).

4.2.7 Obtenção das proteínas citoplasmáticas solúveis

A cultura de bactérias foi centrifugada a 12000xg por 20 min, para obtenção do *pellet* celular que foi suspenso em tampão Tris 20 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,30 M. A suspensão assim obtida foi submetida à lise celular em prensa mecânica *French Press* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), com pressão de 1500 bars. O lisado foi submetido à centrifugação a 13000xg por 20 min e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi utilizado para a purificação do CeEI recombinante.

4.3 Purificação dos CeEIs recombinantes

4.3.1 Cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose

O sobrenadante da cultura contendo os CeEIs recombinantes foi filtrado membrana de 45 µM e, em seguida, foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose (5 ml), equilibrada com 30 ml de tampão Tris 20 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,30 M. A coluna foi lavada com 30 ml do mesmo tampão contendo ainda imidazol 20 mM, para a eluição do material ligado inespecificamente. Finalmente, a eluição das proteínas de interesse foi feita com Tris 20 mM pH 7,5, contendo NaCl

0,30 M e imidazol 0,50 M. As frações obtidas foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre a ação da EN na hidrólise de MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNAN.

4.3.2 Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF conectada a um sistema FPLC

A solução de proteínas, contendo a maior atividade inibitória sobre EN, proveniente da cromatografia de afinidade em Ni-Sepharose, foi dialisada em tampão Tris 50 mM pH 8,0 e centrifugada por 20 min, a 4000xg, a 4°C. O sobrenadante foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em sistema FPLC (G.E. HealthCare (Piscataway, NJ, EUA), usando-se uma coluna HiTrap Q-FF (5,0 ml), equilibrada em tampão Tris 50 mM pH 8,0; a eluição das proteínas foi feita por gradiente de 0 a 100% de NaCl 1,0 M no mesmo tampão. As frações obtidas foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre a ação da EN na hidrólise de MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNAN.

4.3.3 Filtração em gel em coluna PD-10

Para a retirada do excesso de sal, para futura caracterização, as soluções contendo CeEIs recombinantes purificados foram submetidas, separadamente, a uma filtração em gel em coluna PD-10 G.E. HealthCare (Piscataway, NJ, EUA). Após o equilíbrio da coluna em tampão Tris 50 mM pH 8,0, 2,5 ml do material foram aplicados e a separação da proteína foi feita por eluição com o mesmo tampão. As frações eluídas tiveram sua condutividade medida e, em seguida, foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre a ação de EN na hidrólise de MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNAN.

4.4 Caracterização dos CeEIs recombinantes

4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O procedimento baseou-se no método descrito por Laemmli (1970) em um aparelho da *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, CA, EUA).

O gel de corrida foi preparado na concentração de 12%, utilizando-se as seguintes soluções: 2,0 ml de acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,80%, 2,5 µl de TEMED, 1,25 ml de tampão Tris 1,0 M pH 8,8, num volume final de 5,0 ml com dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,10% e persulfato de amônio 2,5 mM. O gel de aplicação de amostras foi preparado na concentração de 5,0%, utilizando-se 560 µl de

acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,80%, 2,5 µl de TEMED, 420 µl de tampão Tris 1,0 M pH 7,0 em um volume final de 2,5 ml com SDS 0,10% e persulfato de amônio 3,0 mM.

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris 5,0 mM pH 7,0, SDS 2,0%, glicerina 20%, uréia 20% e azul de bromofenol 0,012% e diluídas quatro vezes, em água no momento de sua utilização. Nas amostras reduzidas foram adicionados, ainda, 2,0 µl de β-mercaptoetanol. Todas as amostras foram aquecidas em banho-de-areia por 10 min a 100°C. A quantidade de amostra analisada foi de 10 µg de proteína total em um volume máximo de 25 µl.

A corrente usada para a eletroforese foi de 25 mA, até as amostras entrarem no gel de corrida e, em seguida, foi ajustada para 30 mA.

Para a revelação das proteínas por *Coomassie Blue*, o gel foi imerso em solução de 0,1% de *Coomassie Blue* R-250, 0,2% de etanol e 0,1% de ácido fosfórico, por 10 min; em seguida, foi descorado com ácido acético 5,0%.

Após a captura de imagem dos géis em um *scanner* da impressora modelo HP PSC 1315 *all-in-one* da *Hewlett-Packard Company*, L.P. (Palo Alto, CA, EUA), eles foram conservados em ácido acético 5,0% e, posteriormente, secos em um sistema da *Pharmacia Fine Chemicals* (G.E. Healthcare, Piscataway, NJ, EUA).

4.4.2 Determinação da atividade dos inibidores recombinantes sobre a ação de diferentes enzimas

Elastase pancreática - EP (45 nM), EN (1,0 nM), subtilisina A (50 nM), tripsina (40 nM), Cat G (340 nM), calicreína plasmática humana - HuPK (1,0 nM), calicreína renal humana (8,0 nM) e quimotripsina (230 nM) foram separadamente mantidas na ausência ou presença de um dos inibidores em tampões apropriados, durante 10 min a 37°C. Após esse período, foram adicionados os substratos cromogênicos específicos para cada enzima, num volume final de 200 µl, seguindo a tabela abaixo. A hidrólise dos substratos cromogênicos foi acompanhada pela absorbância em 405 nm na leitora de placas, durante 10 min a 37°C.

Enzima	Substrato
Elastase de neutrófilo humano (1,0 nM)	MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan (0,2 mM)
Catepsina G (340 nM)	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (0,3 mM)
Calicreína plasmática humana (1,0 nM)	H-D-Pro-Phe-Arg-pNan (0,5 mM)
Quimotripsina bovina (230 nM)	Suc-Phe-pNan (1,0 mM)
Tripsina bovina (40 nM)	H-D-Pro-Phe-Arg-pNan (0,5 mM)
Elastase pancreática de porco (45 nM)	Suc-Ala-Ala-Ala-pNan (0,5 mM)
Subtilisina A (50 nM)	Boc-Gly-Gly-Leu-pNan (0,2 mM)
Calicreína renal humana (8,0 nM)	Val-Leu-Lys-pNan (0,5 mM)

4.4.3 Determinação das constantes inibitórias (K_i)

Soluções do inibidor, em volumes variáveis, foram pré-incubadas com EN (6,0 nM), Cat G (340 nM), HuPK (1,0 nM), quimotripsina (230 nM) ou com tripsina (40 nM), em tampão apropriado para cada enzima, por 10 min a 37°C. Após esse período, um dos substratos MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan (0,20 mM), Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (0,30 mM), H-D-Pro-Phe-Arg-pNan (0,55 mM), Suc-Phe-pNan (1,0 mM) ou H-D-Pro-Phe-Arg-pNan (0,30 mM) foi, respectivamente, adicionado e a incubação seguiu por 30 min a 37°C, sendo a hidrólise dos substratos acompanhada pela leitura em 405 nm em leitora de placas. A inibição de cada enzima por CeEI recombinante foi medida pela atividade residual da enzima e expressa em relação à hidrólise na ausência do inibidor. A constante inibitória (K_i) foi calculada, assumindo-se um mecanismo do tipo *slow tight-binding* e a formação de um complexo (EI), na proporção de 1:1 entre enzima e inibidor, segundo o modelo de Morrison (1982).

4.5 Estudos cinéticos da ação dos inibidores recombinantes sobre a atividade da EN

Os parâmetros cinéticos da ação dos inibidores sobre a atividade da EN foram determinados, pela hidrólise do substrato cromogênico MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan, acompanhada pela leitura da absorbância em 405 nm, da p-nitroanilina formada, em leitora de placas. Para isso, mediu-se a formação do produto em diversas concentrações de substrato (0,115 a 1,84 mM), na ausência e na presença do rCeEI-4 (0,42 a 46 nM) ou rCeEI-5 (0,52 a 26 nM) em tampão Tris 20 mM pH 7,5 por 30 min a 37°C. As reações foram feitas em duplicata.

A cinética da inibição da EN foi estudada, utilizando-se a seguinte equação:

$$\frac{V_i}{V_0} = \left(\frac{V_0 - V_\infty}{2V_0} \right) \left\{ \left[\left(\frac{1 + \theta \frac{\alpha K_i}{[E^*]_0} + \frac{[I^*]_0}{[E^*]_0} - 1 \right)^2 + 4 \frac{1 + \theta \frac{\alpha K_i}{[E^*]_0}}{\alpha + \theta [E^*]_0} \right]^{1/2} + \frac{V_0 + V_\infty}{V_0 - V_\infty} - \frac{1 + \theta \frac{\alpha K_i}{[E^*]_0} - \frac{[I^*]_0}{[E^*]_0}}{\alpha + \theta [E^*]_0} \right\}$$

onde V_i é a velocidade na presença do inibidor, V_0 é a velocidade na ausência do inibidor, V_∞ é o limite de V_i para uma concentração de saturação do inibidor, $[E^*]_0$ é a concentração inicial de sítios de ligação na enzima, $[I^*]_0$ é a concentração inicial de sítios de ligação no inibidor, θ é a razão da concentração inicial de substrato, K_i é a constante de dissociação aparente do inibidor e α é o parâmetro de perturbação de K_m , que é a constante de Michaelis-Menten.

4.6 Determinação do menor fragmento ativo do inibidor CeEI

Com o auxílio do programa de computador denominado PyMOL, a estrutura terciária do CeEI foi gerada e, após comparação com a de inibidores semelhantes, foi possível determinar seu sítio reativo. Em sequência, foram delimitados três possíveis fragmentos ativos: um contendo uma ponte de dissulfeto e o sítio reativo (fragmento 36 - CeEI36), outro sem a ponte de dissulfeto, mas contendo o sítio reativo (fragmento 46 - CeEI46) e um terceiro fragmento menor contendo somente o sítio reativo (fragmento 55 - CeEI55). O CeEI36 e CeEI46 seriam produzidos por Biologia Molecular e expressos em bactérias. Já o CeEI55, por ser pequeno, contendo apenas 23 aminoácidos, seria sintetizado. Além disso, a sequência teórica dos fragmentos foi submetida a um sítio científico (www.expasy.org) no qual foram calculadas a quantidade de aminoácidos, a massa molecular, com ou sem a cauda de histidina, e o ponto isoelétrico, com ou sem a cauda de histidina, para os três fragmentos.

4.6.1 Construção dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram construídos com base na sequência de nucleotídeos do DNA de CeEI-4. Sabendo a localização do sítio reativo e a estrutura da molécula, delimitaram-se fragmentos do inibidor possivelmente ativo. Como a expressão de fragmentos pequenos é mais eficiente em leveduras, também foi desenhado um oligonucleotídeo, no qual foi adicionado o sinal de terminação (*stop codon*) no final da sequência, para expressão em *Pichia pastoris*. Fez-se uma análise de restrição e os

oligonucleotídeos foram construídos com dois sítios de restrição, sendo que para a expressão em bactérias, foram utilizados os sítios de restrição de *BamH I* e *Xho I* e para a expressão em leveduras, os sítios de *SnaB I* e *Avr II*. As sequencias são apresentadas a seguir:

CeEI36fw: primer foward para o fragmento 36 expresso em bactérias

5' CGCGGATCCGAACGAAACATGTCCCATTCTG 3'

CeEI36rev: primer reverse para o fragmento 36 expresso em bactérias:

5' CGGCTCGAGG AAGGTGTCTC GGCACATGTT GG 3'

CeEI46fw: primer foward para o fragmento 46 expresso em bactérias:

5' CGCGGATCCGTCTCCCTATGAGACCGAACATGG 3'

CeEI46rev: primer reverse para o fragmento 46 expresso em bactérias:

5' CGGCTCGAGT AAGGACAAGG GAAGGCCTTC GTA 3'

CeEI36fwppic: primer foward para o fragmento 36 expresso em leveduras:

5' GAA GCT TAC GTA AAC GAA ACA TGT CCC ATT TC T G 3'

CeEI36revppic: primer reverse para o fragmento 36 expresso em leveduras:

5' TGA CCT AGG TCA TAA GGA CAA GGG AAG GCC TTC 3'

4.6.2 Amplificação dos fragmentos de DNA de CeEI por PCR

Após o seqüenciamento do fragmento do gene CeEI, foram construídos oligonucleotídeos (*primers*) específicos na posição 3' e 5' para as porções pré-determinadas do fragmento de CeEI. Para as PCR foram necessários os seguintes reagentes: 0,1 a 1 ng de DNA molde, oligonucleotídeos (100 pmol cada) para as respectivas porções do fragmento de interesse (CeEI36FW e CeEI36RV), (CeEI46FW e CeEI46RV) e (CeEI36FWppic e CeEI36RVppic), iniciadores que flanqueiam os fragmentos de DNA a serem amplificados, *dNTP mix* (0,2 mM), $MgCl_2$ (2,5 mM) e *Taq* polimerase (1 U) em um volume final de 50 μ l. As reações foram submetidas aos seguintes ciclos:

Passo	Temperatura (°C)	Tempo
1 - desnaturação	94	5 min
2 - desnaturação	94	40 s
3 - anelamento	60	40 s
4 - polimerização	72	100 s
5 - polimerização	72	5 min

Os passos 2, 3 e 4 foram repetidos 35 vezes.

4.6.3 Clonagem do produto de PCR em vetor de clonagem pGEM[®]-T easy

Depois da reação de PCR com os oligonucleotídeos, contendo o sítio de restrição adequado para cada vetor, fez-se a ligação em vetor pGEM[®]-T easy, usando-se o kit pGEM[®]-T Easy Vector System I. Para a ligação dos fragmentos de interesse aos plasmídeos linearizados, foi utilizado um excesso molar do fragmento, mantendo-se as proporções vetor:fragmento entre 1:250 e 1:300. Num volume final de 10 µl, foram adicionados os fragmentos de DNA, vetor linearizado, tampão de ligação duas vezes concentrado (Tris 60 mM pH 7,8, contendo MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM e polietilenoglicérol 10%) e a enzima T₄ ligase (1U). As misturas foram incubadas por 16 h, a 16°C, recebendo posteriormente etanol para precipitação, da mesma forma já descrita acima.

4.6.4 Midi preparação do DNA plasmidial

Para as preparações do DNA plasmidial, em escala semi-preparativa, utilizou-se o QIAGEN[®] *Plasmid Midi Kit*. O DNA plasmidial foi isolado, utilizando-se o princípio baseado no método modificado de lise alcalina do *pellet* celular. Uma colônia de bactérias isoladas foi incubada em 500 ml de meio de cultura, por aproximadamente 12 h a 37°C, sob agitação (180 rpm). O material foi centrifugado a 6000xg por 15 min a 4°C e o *pellet* obtido foi suspenso em 4 ml da solução P1. Em seguida, adicionaram-se 4 ml da solução P2 e o material foi deixado por 5 min à temperatura ambiente. Foram adicionados, então, 4 ml da solução P3 e a mistura permaneceu por 15 min em banho de gelo, para depois, ser submetida a uma centrifugação a 13000xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e centrifugado novamente nas mesmas condições descritas. O sobrenadante obtido foi aplicado à coluna QIAGEN tip-100, previamente equilibrada com o tampão QBT, e a lavagem foi realizada com o tampão QC. O DNA foi eluído com o tampão QF e rapidamente precipitado pela adição de 3,5 ml de isopropanol; após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com 2 ml de etanol 70%, centrifugado e seco à temperatura ambiente. O *pellet* de DNA resultante foi dissolvido em 200 µl do tampão TE.

4.6.5 Digestão de DNA com enzima de restrição

O plasmídeo e os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram digeridos com as enzimas de restrição adequadas. Para o CeEI36 e o CeEI46, a digestão foi feita com as enzimas *BamH I* e *Xho I*. Já para o CeEI36pPIC9K, cuja expressão seria

feita em leveduras, o plasmídeo foi digerido com as enzimas *SnaB I* e *Avr II*. Como os tampões e a temperatura de ação de ambas as enzimas eram incompatíveis, as enzimas foram usadas em reações diferentes, seguidas de precipitação, conforme já descrito. O plasmídeo pET-26b (160 ng) foi incubado com *BamH1* (10 U), em um volume final de 25 µl, por 18 h; paralelamente, cerca de 50 ng do pGEM T foram digeridos sob as mesmas condições. Após a precipitação com etanol, o material foi submetido à segunda digestão com *Xho I*, por 10 h, 37°C. O vetor pGEM T, contendo o inserto do fragmento 36 e o vetor pPIC9K foram digeridos primeiramente com a enzima de restrição *Avr II* (10 U) por 18 h a 37°C e, após a precipitação, o material foi submetido à segunda digestão com *SnaB I* por 4 h a 37°C. O produto da digestão foi analisado por gel de agarose e, em seguida, purificado do gel de agarose como já descrito anteriormente.

4.6.7 Reação de ligação de fragmentos de DNA ao plasmídeo pET-26b

Para a ligação dos fragmentos de interesse aos plasmídeos linearizados, foi utilizado um excesso molar do fragmento, mantendo-se as proporções vetor:fragmento entre 1:250 e 1:300. Num volume final de 10 µl, foram adicionados os fragmentos de DNA previamente digeridos, vetor linearizado, 1 µl de tampão de ligação Tris 10 mM pH 7,8, contendo MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM e a enzima T₄ ligase (3 U). As misturas foram incubadas por 16 h a 18°C; posteriormente foi adicionado etanol para precipitação dos plasmídeos, conforme item descrito anteriormente.

4.6.8 Linearização do plasmídeo pPIC9K para eletroporação em leveduras *Pichia pastoris* competentes

O plasmídeo pPIC9K contendo o fragmento 36, purificado por método de preparação de DNA, foi linearizado com a enzima de restrição *Sal I*. Aproximadamente 10 µg do plasmídeo foram incubados por 16 h a 37°C com o *Sal I* (10 U) e, em seguida, o DNA foi precipitado com etanol, como já descrito acima.

4.6.9 Transformação de bactérias competentes *E. coli* cepa TG1 por eletroporação

Uma mistura de 0,5 µg de DNA e 200 µl de bactérias *E. coli* TG1 competentes. foi transferida para uma cubeta de eletroporação gelada. Após a eletroporação (2,5

μ FD, 2,5 kV e 200 Ω), 800 μ l de meio de cultura Hanahan's Broth (SOC) foram adicionados às bactérias e a mistura foi incubada por 1 h a 37°C, sob agitação (180 rpm). Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido de cultura *Luria-Bertani* (LB/ágar) contendo canamicina (15 μ g/ml) e as placas foram incubadas por 12 h a 37°C. As bactérias transformadas com vetores pET-26b recombinantes foram selecionadas pela resistência à canamicina. Em seguida, as colônias foram analisadas, conforme já descrito acima.

4.6.10 Transformação de bactérias competentes da cepa *BL21SI* de *E. coli* por choque térmico

O procedimento foi de acordo com o item sobre transformação, já descrito; porém, para a seleção das bactérias, utilizou-se somente a canamicina (15 μ g/ml) como antibiótico. Em seguida, as colônias foram analisadas.

4.6.11 Expressão dos fragmentos de CeEIs recombinantes em escala analítica em bactérias

Primeiramente, os clones positivos foram cultivados em escala analítica, para a confirmação da expressão do fragmento de interesse (fragmento 36 e 46), após a indução com NaCl 30 mM. Algumas colônias de BL21SI, transformadas com o plasmídeo pET-26b, contendo os fragmentos de DNA de interesse, foram inoculadas em 3 ml de meio LB, contendo o antibiótico canamicina (15 μ g/ml) e foram incubadas por aproximadamente 24 h a 37°C, sob agitação (180 rpm), período suficiente para atingir a leitura de 0,600 para a absorvância em 550 nm. Após alcançarem a fase exponencial, as culturas foram divididas em três alíquotas: 1 ml foi destinado à preparação de uma cultura para estoque a -70°C, 1,5 ml foram utilizados para confirmação da síntese proteica, induzida pela adição de NaCl 30 mM e 1,5 ml restantes foram utilizados como controle do nível de expressão basal. As alíquotas equivalentes às culturas induzidas e não induzidas foram mantidas por 12 h a 37°C, sob agitação.

4.6.12 Expressão do fragmento de CeEI recombinante em escala preparativa em bactérias

Uma das colônias, que apresentou expressão do fragmento de interesse, foi empregada para fermentação em escala preparativa.

A colônia foi inoculada em 10 ml de meio LB contendo canamicina (15 µg/ml) e incubada por 24 h a 37°C, sob agitação constante (180 rpm). A cultura foi adicionada a 1,0 l do mesmo meio e incubada nas mesmas condições anteriores, até atingir 0,700 de absorbância em 600 nm. Em seguida, NaCl 30 mM foi adicionado à cultura, para a indução da expressão da proteína, que foi mantida por 20 h a 37°C, sob agitação constante (180 rpm).

4.7 Transformação, análise e expressão de proteína em leveduras

4.7.2 Preparação de leveduras competentes de *Pichia pastoris* para eletroporação

As leveduras foram preparadas no mesmo dia da eletroporação. Para isso, uma colônia isolada foi inoculada em 2,5 ml do meio YPD e incubada por 18 h a 30°C, sob agitação de 210 rpm. Essa pré-cultura foi diluída em 250 ml de meio YPD e incubada a 30°C, sob agitação, até alcançar a fase exponencial ($A_{600} = 1,3 - 1,5$). A cultura foi centrifugada a 4000xg por 20 min a 4°C e lavada duas vezes com H₂O estéril gelada (250 e 125 ml) para reduzir a força iônica da suspensão. Em seguida, as leveduras foram novamente lavadas com 20 ml de sorbitol 1 M gelado e depois ressuspensas em 2 ml de sorbitol 1 M. A suspensão de leveduras foi separada em alíquotas de 80 µl e mantidas a 4°C até o uso.

4.7.3 Eletroporação de leveduras *Pichia pastoris* competentes

Adicionaram-se 9,6 µg de DNA plasmidial linearizado a uma alíquota de 80 µl de leveduras de *P. pastoris* competentes e essa mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação gelada. Após as leveduras terem sido submetidas à eletroporação (25 µFD, 1,5 kV e 400 Ω), 1 ml de sorbitol 1 M foi adicionado e a mistura foi incubada por 45 min à temperatura ambiente, sob agitação (180 rpm). Em seguida, as leveduras foram plaqueadas em meio sólido de cultura dextrose mínima (MD/ágar) e incubadas por 48 h a 30°C. As leveduras transformadas com vetores pPIC9K recombinantes foram selecionadas. As colônias transformantes foram analisadas por PCR e utilizadas em experimentos de expressão de proteínas.

4.7.4 Expressão do fragmento de CeEI recombinante em escala analítica em leveduras

Primeiramente, os clones positivos em *P. pastoris* foram cultivados em escala analítica para a verificação da maior expressão do fragmento de interesse, após cinco dias de indução com metanol (0,5%). Algumas colônias de leveduras, transformadas com o plasmídeo pPIC9K, contendo o fragmento de cDNA de interesse, foram inoculadas em 2,5 ml de meio BMGY e incubadas por aproximadamente 30 h a 30°C, sob agitação (220 rpm), período suficiente para atingir a leitura de 2,0 de absorbância em 600 nm. Após alcançarem a fase exponencial, as culturas foram centrifugadas a 4000xg, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se o meio BMMY, até que a leitura da absorbância em 600 nm alcançasse o valor de 1,00 (aproximadamente 10 ml). Durante um período de cinco dias, as colônias permaneceram a 30°C, sob agitação a 220 rpm e receberam diariamente metanol (0,5%) para a indução da expressão da proteína. Em cada um desses dias, uma alíquota (500 µl) do meio de cultura foi retirada, para análise da atividade inibitória.

4.7.5 Expressão do fragmento de CeEI recombinante em escala preparativa em leveduras

A cultura que apresentou melhor atividade inibitória foi escolhida para a expressão em escala preparativa. Para isso, a colônia foi incubada em 120 ml de meio BMGY, por aproximadamente 48 h a 30°C, sob agitação (220 rpm), período para que a leitura da absorbância em 600 nm atingisse 2,2. Após alcançar a fase exponencial, a cultura foi centrifugada a 4000xg, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se meio BMMY, até que a leitura da absorbância em 600 nm alcançasse o valor de 1,00 (aproximadamente 400 ml). Durante cinco dias as colônias permaneceram a 30°C, sob agitação (220 rpm) e receberam diariamente metanol (0,5%) para a indução da expressão da proteína.

4.8 Purificação dos fragmentos de CeEI recombinantes expressos em bactérias

4.8.1 Obtenção das proteínas do periplasma das bactérias

A cultura de bactérias foi centrifugada a 8000xg por 15 min, para obtenção do *pellet* celular que foi suspenso em 400 ml de tampão Tris 30 mM pH 8,0 contendo

sacarose 20%; em seguida, adicionou-se EDTA gelado (1 mM), a mistura foi centrifugada a 10000xg, por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi testado quanto a sua atividade inibitória sobre EN. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em 400 ml de MgSO₄ 5 mM gelado. A suspensão foi mantida durante 10 min em gelo e centrifugada a 12000xg, por 15 min a 4°C. O sobrenadante, transferido para um novo tubo, foi novamente centrifugado.

4.8.2 Cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose

As soluções contendo os fragmentos das proteínas recombinantes foram filtradas em membrana de 45 µm e submetidas, separadamente, a uma cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose (5 ml), equilibrada com 30 ml de tampão Tris 20 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,30 M. A coluna foi lavada com 30 ml do mesmo tampão contendo também imidazol 0,02 M e, em seguida, tratada com o mesmo tampão com imidazol 0,50 M. As frações foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre EN, de acordo com o item já descrito acima.

4.8.3 Filtração em gel em coluna PD-10

Para a retirada do imidazol, as soluções contendo os fragmentos de CeEI recombinantes foram submetidas, separadamente, a uma filtração em gel em coluna PD-10. Após o equilíbrio da coluna em tampão Tris 50 mM pH 8,0, 2,5 ml do material foram aplicados e a separação da proteína foi feita por eluição no mesmo tampão. As frações tiveram sua condutividade medida e foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre a ação de EN.

4.8.4 Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrapQ conectada em sistema FPLC

A solução contendo a maior atividade inibitória sobre EN foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em sistema FPLC, usando-se uma coluna HiTrap Q-FF (5,0 ml), equilibrada em tampão Tris 50 mM pH 8,0; a eluição das proteínas foi feita por gradiente de 0 a 100% de NaCl 1,0 M no mesmo tampão. As frações foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre a ação da EN.

4.8.5 Filtração em gel em coluna Superdex G-30

A solução contendo o fragmento do inibidor foi submetida a uma filtração em gel, em coluna Superdex G-30 (30 ml) equilibrada em tampão Tris 20 mM pH 8,0, acoplada a um cromatógrafo ÄKTA (GE – Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). A eluição das proteínas foi feita no mesmo tampão, num fluxo de 1,5 ml/min. As frações foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre EN. As frações com as maiores atividades inibitórias foram separadas para a próxima etapa.

4.8.6 Cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈

As frações recolhidas da filtração em gel, com maior atividade inibitória sobre EN, foram liofilizadas, dissolvidas em ácido trifluoracético (TFA) 0,1%, filtradas em membrana de 0,45 µm e submetidas à cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC (Shimadzu, Japão); a coluna C₁₈, equilibrada em TFA 0,1%, teve as proteínas eluídas por gradiente de 0 a 95% de acetonitrila (ACN) em TFA 0,1%. Das proteínas eluídas foram determinadas as sequências de aminoácidos.

4.9 Purificação dos fragmentos de CeEI recombinantes expressos em leveduras

4.9.1 Obtenção das proteínas do meio de cultura das leveduras

Após uma centrifugação a 4000xg por 20 min a 4°C, o sobrenadante foi separado, para a precipitação das proteínas ser feita por acetona.

4.9.2 Fracionamento por acetona

Acetona gelada foi adicionada lentamente ao sobrenadante descrito no item anterior, até serem alcançadas as concentrações finais de 40%, 60% e 80%, sob leve agitação, a 4°C. Após as precipitações, as suspensões foram deixadas em repouso por 30 min para decantação inicial; em seguida, foram centrifugadas a 4000xg, por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os respectivos precipitados, secos à temperatura ambiente, foram dissolvidos em tampão Tris 50 mM pH 8,0, filtrados em membrana de 45 µm e tiveram sua capacidade inibitória sobre EN determinada.

4.9.3 Filtração em gel em coluna Superdex G-75

A solução obtida no item anterior, contendo o fragmento do inibidor, foi submetida a uma filtração em gel, em coluna Superdex G-75 (30 ml) equilibrada em tampão Tris 20 mM pH 8,0, acoplada ao cromatógrafo ÄKTA. A eluição das proteínas foi feita no mesmo tampão, num fluxo de 0,5 ml/min. As frações foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre EN.

4.9.4 Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF

A fração da filtração em gel, contendo a maior atividade inibitória sobre EN, foi submetida a uma cromatografia de troca iônica, em sistema FPLC, em uma coluna HiTrap Q-FF (5,0 ml), equilibrada em tampão Tris 50 mM pH 8,0; a eluição das proteínas foi feita por gradiente de 0 a 100% de NaCl 1,0 M no mesmo tampão. As frações foram testadas quanto à sua atividade inibitória sobre a ação da EN e as frações reativas foram submetidas a uma filtração em gel em coluna PD-10, como descrito anteriormente.

4.9.5 Cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈

As frações recolhidas da filtração em gel, com maior atividade inibitória sobre EN, foram liofilizadas, dissolvidas em TFA 0,1%, filtradas em membrana de 0,45 µm e submetidas à cromatografia de fase reversa, em sistema de HPLC, usando-se uma coluna C₁₈, equilibrada em TFA 0,1%. A eluição das proteínas foi feita por gradiente de 0 a 95% de ACN em TFA 0,1%. As proteínas eluídas tiveram seus aminoácidos seqüenciados.

4.10 Caracterização dos fragmentos de CeEI recombinantes

Os fragmentos de CeEI recombinantes e do sintetizado foram caracterizados das seguintes maneiras:

4.10.1 Determinação da atividade do fragmento 55 do inibidor

O fragmento 55 foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Clóvis Nakaie do Departamento de Biofísica da UNIFESP. Foi preparada uma solução de 1 mg/ml desse fragmento em tampão Tris 50 mM pH 8,0, e volumes variáveis dessa solução foram pré-incubados com EN (1,0 nM) por 10 min a 37°C. Após esse período, MeO-

Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan (0,20 mM) foi adicionado e a incubação seguiu por 30 min a 37°C, sendo a hidrólise do substrato acompanhada pela leitura da absorbância em 405 nm, na leitora de placas.

4.10.2 Determinação da seqüência N-terminal dos fragmentos do inibidor recombinante

Foi realizado o seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal dos fragmentos do inibidor, somente para confirmação da proteína, pois a seqüência já era conhecida. Para isso, utilizou-se a degradação de Edman (1956), em um PPSQ-23 Model Protein Sequencer (Shimadzu, Tokyo, Japan).

4.10.3 Determinação da atividade dos inibidores recombinantes

A enzima EN (1,0 nM) foi pré-incubada na ausência ou presença de um dos fragmentos do inibidor em tampão Tris 20 mM pH 8,0, durante 10 min a 37°C. Após esse período, foi adicionado o substrato cromogênico MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan (0,2 mM), num volume final de 200 µl. A hidrólise do substrato cromogênico foi acompanhada pela absorbância em 405 nm em leitora de placas, durante 10 min a 37°C.

4.10.4 Determinação das concentrações ativas dos fragmentos

Soluções do fragmento do inibidor, em volumes variáveis, foram pré-incubadas com EN (1,0 nM) em tampão Tris 50 mM pH 8,0, por 10 min a 37°C. Após esse período, MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan (0,20 mM) foi adicionado e a incubação seguiu por 30 min a 37°C, sendo a hidrólise do substrato acompanhada pela leitura da absorbância em 405 nm em leitora de placas. A inibição da enzima por cada fragmento foi medida pela atividade residual da enzima e expressa em relação à hidrólise promovida na ausência do inibidor. A concentração do inibidor foi calculada, assumindo-se um mecanismo do tipo *slow tight-binding* e a formação de um complexo (EI), na proporção de 1:1 entre enzima e inibidor, segundo o modelo de Morrison (1982).

4.10.5 Cromatografia líquida/espectrometria de massa do fragmento 46

Alternativamente, parte do material do fragmento 46 foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização por

eletrospray (LC/ESI-MS), usando um instrumento Micromass modelo ZMD (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um sistema de HPLC da *Waters Alliance* modelo 2690. O fragmento foi aplicado em uma coluna de fase reversa (Nova Pak C₁₈ – 2,1x150 mm), lavado com TFA 0,1% e eluído com gradiente linear de 5 a 95% do solvente TFA 0,1% em ACN 60%, em 30 min, num fluxo de 0,4 ml/min e detecção em 190-300 nm.

4.11 Modelo de edema pulmonar *in vivo*

Para o estabelecimento desse modelo, seguiu-se a metodologia descrita por Duong *et al.* (2001), com algumas modificações. Além do inibidor recombinante rCeEI-4 que inibe tanto EN quando Cat G, também utilizou-se o CeKI, inibidor nativo, isolado de sementes de *C. echinata* que possui atividade inibitória sobre Cat G, sem inibir EN.

4.11.1 Indução de edema pulmonar em ratos

Ratos Wistar, adquiridos do Biotério do INFAR, de três meses foram pesados, identificados e anestesiados com xilasina e ketamina. Os animais foram identificados e agrupados segundo a tabela descrita abaixo. Foram injetados por via endovenosa na cauda dos ratos 500 µl de tampão Tris 50 mM pH 8,0, CeKI ou rCeEI nas diferentes concentrações. Após 20 min desse tratamento, os ratos foram submetidos a uma traqueostomia e receberam uma instilação na traquéia de tampão Tris 50 mM pH 8,0 ou 75 µl de lipopolissacarídeo - LPS - (1 mg/ml) dissolvidos no mesmo tampão. Resumidamente, os animais foram tratados da seguintes maneira:

nome do grupo	cauda	traquéia	n
1 controle negativo	tampão Tris 50 mM pH 8,0	tampão Tris 50 mM pH 8,0	8
2 controle positivo	tampão Tris 50 mM pH 8,0	lipopolissacarídeo 75 µg	6
3 CeKI 2,6 mg	CeKI 2,6 mg	lipopolissacarídeo 75 µg	6
4 CeKI 7,8 mg	CeKI 7,8 mg	lipopolissacarídeo 75 µg	5
5 rCeEI 0,84 mg	rCeEI 0,84 mg	lipopolissacarídeo 75 µg	5
6 rCeEI 2,6 mg	rCeEI 2,6 mg	lipopolissacarídeo 75 µg	5

Depois de seis horas, os ratos foram anestesiados novamente, tiveram seu tórax aberto, a veia cava inferior foi cortada e todo o sangue coletado, sendo que metade do sangue foi incubada por 30 min na presença de EDTA 34 mM e a outra metade foi mantida por 1 h à temperatura ambiente. O pulmão foi retirado do animal, canulado e

lavado com 10 ml de tampão fosfato 10 mM pH 7,4; esse lavado foi denominado BAL (lavado bronqueoalveolar) e foi mantido em banho de gelo. Após a lavagem, o pulmão foi congelado a -80°C, até o uso.

4.11.2 Preparo das amostras de plasma, soro e pulmões dos animais

Para obtenção do plasma, 3 ml de sangue foram incubados com 1 ml de EDTA 163 mM, por 1 h em banho de gelo e centrifugados por 15 min a 270xg a 4°C.

Para a obtenção do soro, o sangue foi mantido por 1 h à temperatura ambiente e centrifugado nas mesmas condições anteriores.

Os pulmões foram descongelados e homogeneizados em 10 ml de tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Em seguida, o material foi centrifugado por 30 min a 3000xg a 4°C.

Os sobrenadantes resultantes dessas centrifugações foram, então, separados para serem utilizados nos próximos passos.

4.11.3 Contagem das células PMN no BAL

Separaram-se 20 µl do BAL de cada animal para a contagem de células de defesa. Para isso, 20 µl de azul de trypan foram adicionados ao BAL. A metodologia de azul de trypan baseia-se no fato desse corante penetrar somente em células que perderam a integridade da membrana plasmática; entretanto, o azul de trypan, apesar de não ser capaz de penetrar em células viáveis, facilita a identificação celular, já que forma um halo azul ao redor das células viáveis.

As células PMN foram contadas em um microscópio óptico comum, usando-se uma Câmara de Neubauer. O total de células vivas foi calculado em relação ao total de células encontradas e expresso em porcentagem. O restante do líquido foi centrifugado por 10 min a 3400xg a 4°C, para a obtenção do lavado livre de células que foi congelado a -80°C, até o uso.

4.11.4 Determinação da quantidade total de proteínas nas amostras

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), usando-se o reagente *Bio-Rad Protein Assay*, conforme as instruções do fabricante. Para o cálculo da concentração das proteínas (em triplicata), foi usada uma curva padrão construída com soluções de albumina bovina.

4.11.5 Eletroforese das amostras de BAL

A metodologia utilizada já foi descrita anteriormente.

4.11.6 Verificação de atividade do tipo EN nas amostras

Amostras de pulmão, plasma, soro ou BAL (10 µl) foram mantidas em tampão Tris 50 mM pH 7,4, por 5 min a 37°C e, em seguida, o substrato cromogênico MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan (0,5 mM) foi adicionado, num volume final de 200 µl. A hidrólise do substrato cromogênico foi acompanhada pela absorbância em 405 nm, durante 30 min a 37°C, em leitora de placas. Alternativamente, foram feitas algumas reações com o substrato fluorogênico MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (10 µM). As reações foram feitas em triplicatas.

A absorbância em 405 nm foi transformada em concentração, usando-se o coeficiente de extinção molar da *p*-nitroanilina ($\epsilon = 8990 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e foi calculada a velocidade de cada reação, considerando-se a concentração total de proteína de cada amostra.

4.11.7 Extração de cinina do sangue, plasma, pulmão e BAL

Para a extração de cinina do plasma (150 µl), pulmão (200 µl) e BAL (500 µl) foi utilizado o procedimento descrito por Shimamoto *et al* (1992) e modificado por nosso grupo (Malavazi-Piza *et al*, 2004).

Durante todo o processo de extração, as amostras e os solventes foram mantidos em banho de gelo. As amostras, nos volumes especificados acima, foram misturadas com um coquetel de inibidores constituído por SBTI 24 µM, lisinopril 10 µM, EDTA 10 mM, TPCK 100 µM, E-64 10 µM, o-fenantrolina 5 mM, AEBSF 1mM e aprotinina 9 µM em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 com NaCl 0,14 M; em seguida as amostras foram centrifugadas a 950xg por 15 min a 4°C e o precipitado descartado.

Aos sobrenadantes obtidos foi adicionado etanol gelado (2:1, v/v), sob agitação por 30 s, e a mistura foi centrifugada a 950xg por 15 min a 4°C. Dessa nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um outro tubo e seco, a vácuo, a 60°C. Uma mistura de água, acetona e éter de petróleo (1:2:7, v/v/v) foi adicionada ao precipitado e, após agitação vigorosa por 30 s, a mistura foi centrifugada a 950xg por 15 min a 4°C. A fase lipídica, dissolvida no éter de petróleo, foi desprezada e a fase acetona-água foi seca, a vácuo, a 60°C.

4.11.8 Dosagem das cininas por radioimunoensaio

Para se quantificar cininas em cada amostra foi usado o método descrito por Shimamoto *et al* (1992) e modificado por nosso grupo (Araújo *et al*, 1996).

As amostras secas a vácuo foram dissolvidas em 300 µl de tampão EAB (fosfato 10 mM pH 7,0, NaCl 0,14 M, NaN₃ 0,1%, EDTA 30 mM, o-fenantrolina 3 mM e albumina de ovo 0,1%). Duplicatas de 50 µl dessas amostras e de soluções padrão de bradicinina (BK), em diluições seriadas (8, 16, 32, 63 e 125 pg/50 µl), foram incubadas com 100 µl de anticorpo anti-BK e com 100 µl de uma solução de tirosil-BK marcada com ¹²⁵Iodo, por aproximadamente 22 h a 4°C. Decorrido esse período, foram adicionados 400 µl de γ-globulina 0,1% em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, com NaCl 0,14 M e NaN₃ 0,1% e 800 µl de polietilenoglicol (PEG) 6000 25%, mantendo-se a incubação por 10 min a 4°C. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 2000xg por 20 min a 4°C e os sobrenadantes aspirados. A radiação dos precipitados foi medida em um contador γ (Auto Cobra II da Packard Instrument Company, Illinois, EUA). Os valores obtidos da radiação, nas diferentes amostras foram convertidos em pg de BK por comparação com os dados da curva padrão.

4.11.9 Verificação da atividade enzimática do tipo enzima conversora de angiotensina (ECA) nas amostras

Amostras de pulmão, soro ou BAL (5 µl) foram mantidas em tampão Tris 50 mM pH 7,4, contendo 50 mM de NaCl, por 5 min a 37°C e, em seguida, o substrato fluorogênico Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH (10 µM) foi adicionado, num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada em λ_{exc} 320 nm e λ_{em} 420 nm, durante 30 min a 37°C, na leitora de placas. As reações foram feitas em triplicatas. Também foram feitas algumas reações contendo lisinopril (10 µM), inibidor de ECA. A leitura da fluorescência foi transformada em concentração do fragmento obtido, usando-se a constante do aparelho; a velocidade de cada reação foi calculada, considerando-se a concentração total de proteína de cada amostra.

4.11.10 Verificação da atividade enzimática do tipo de mieloperoxidase (MPO) nas amostras

Amostras de pulmão, plasma, soro ou BAL (5 µl) foram mantidas em tampão Tris 50 mM pH 7,4, por 5 min a 37°C e, em seguida, o-dianisidina (1,5 mM) e H₂O₂ (22 mM)

foram adicionados num volume final de 200 μ l. A redução do substrato foi acompanhada pela absorvância em 450 nm, durante 5 min a 37°C, na leitora de placas. As reações foram feitas em triplicatas. Também foram feitas algumas reações contendo azida de sódio (1 mM), inibidor de MPO.

A absorvância em 450 nm foi transformada em concentração usando-se o coeficiente de extinção molar da *o*-dianisidina oxidada ($\epsilon = 8300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e foi calculada a velocidade de cada reação, considerando-se a concentração total de proteína de cada amostra.

4.11.11 Verificação da atividade enzimática do tipo Cat G nas amostras

Amostras de pulmão ou BAL (10 μ l) foram mantidas em tampão Tris 50 mM pH 7,4, contendo 50 mM de NaCl, por 5 min a 37°C e, em seguida, o substrato fluorogênico Abz-Thr-Pro-Phe-Ser-Gly-Gln-EDDnp (20 μ M) foi adicionado, num volume final de 200 μ l. A reação foi acompanhada em λ_{exc} 320 nm e λ_{em} 420 nm, durante 30 min a 37°C, na leitora de placas. As reações foram feitas em triplicatas. A leitura da fluorescência foi transformada em concentração do fragmento obtido, usando-se a constante do aparelho; a velocidade de cada reação foi calculada, considerando-se a concentração total de proteína de cada amostra.

4.11.12 Verificação de atividade inibitória para EN e Cat G nas amostras

EN (0,5 nM) ou Cat G (10 nM) foi incubada com amostras, em volumes crescentes (0, 20, 40 ou 80 μ l) de BAL ou pulmão, e foram mantidas em tampão Tris 50 mM pH 7,4, por 5 min a 37°C; em seguida, foi adicionado o respectivo substrato fluorogênico MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC ou Abz-Thr-Pro-Phe-Ser-Gly-Gln-EDDnp (20 μ M), num volume final de 200 μ l. A hidrólise do substrato foi acompanhada respectivamente em λ_{exc} 360 nm e λ_{em} 460 nm e λ_{exc} 320 nm e λ_{em} 420 nm, durante 30 min a 37°C, na leitora de placas. As reações foram feitas em triplicatas.

4.11.13 Dosagem da quantidade de interleucina (IL)-6, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) nas amostras

Para a quantificação da concentração desses indicadores de inflamação, foram utilizados os kits *Quantikine immunoassay* de IL-6, IL-10 e TNF- α , de acordo com as especificações do fabricante; resumidamente, foram colocados 50 μ l de *assay diluent* em cada poço e, em seguida, foram adicionados 50 μ l da amostra, do controle ou da

solução para curva padrão. Somente as amostras de pulmão foram diluídas dez vezes em tampão Tris 50 mM pH 7,4. Em seguida, agitou-se a placa por cerca de 1 min que depois foi mantida por 2 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada por cinco vezes. Adicionaram-se 100 µl do conjugado e, novamente a placa foi mantida por 2 h à temperatura ambiente e lavada em seguida por mais cinco vezes. Foram adicionados 100 µl da solução contendo substrato e a placa, protegida da luz, foi mantida por mais 30 min à temperatura ambiente. Finalmente, adicionaram-se 100 µl da *stop solution* e foram feitas as leituras da absorbância em 450 nm, na leitora de placas.

As concentrações das soluções de IL-6, IL-10 e TNF- α , de cada amostra, foram calculadas segundo as curvas padrão construídas. Esses valores foram corrigidos, levando-se em conta a concentração de proteína da respectiva amostra. Para avaliar a taxa antiinflamatória, dividiram-se as concentrações de TNF- α por IL-10, para se obter a razão TNF- α /IL-10.

4.11.14 Análise estatística

Para todos os testes enzimáticos, primeiramente foram calculadas as velocidades das reações; depois de considerados os valores das concentrações de proteínas de cada amostra, foram calculados os valores das médias e desvios padrão para cada grupo e para cada enzima. Esses valores foram estatisticamente avaliados por ANOVA e considerados diferentes quando $p < 0,05$.

4.12 Padronização de uma cultura de células pulmonares do tipo II

4.12.1 Cultura de células de pulmão do tipo II

Para a cultura de células de pulmão do tipo II, seguiu-se o método de Steimer *et al.* (2006), com algumas modificações.

Três ratos recém-nascidos (três dias) foram anestesiados; seus pulmões foram retirados e lavados três vezes com tampão fosfato 10 mM pH 7,4 estéril. Os pulmões foram submetidos a uma fragmentação mecânica, com o auxílio de uma tesoura. Pequenos pedaços foram transferidos para um tubo tipo Falcon contendo 5 ml do mesmo tampão e, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foi feita uma nova fragmentação. O material ficou em repouso, em banho de gelo, por 1 hora e meia, para diminuir a contaminação com macrófagos, já que eles aderem às paredes do tubo de plástico. Após esse período, foram adicionados 5 ml de tripsina 25 mg/ml, contendo

EDTA 6,2 mg/ml e a mistura foi incubada por 45 min a 37°C. Para parar a reação, foi utilizado soro fetal bovino 10% e, em seguida, a suspensão foi centrifugada a 400xg por 10 min.

Foram cuidadosamente adicionados a essa mistura, 10 ml de histopaque 1077 e a solução resultante foi submetida a uma nova centrifugação a 400xg por 30 min. As células que ficaram no anel correspondente à densidade do histopaque foram coletadas e lavadas duas vezes com o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo soro fetal bovino 10% e penicilina 1000 U/l, e transferidas para uma garrafa de cultura de 50 ml. Em seguida, essas células foram colocadas em 5 ml desse meio e mantidas em estufa a 37°C e CO₂ 5%.

4.12.2 Caracterização das células em cultura

As células foram fixadas em *p*-formaldeído 3% em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 por 15 min à temperatura ambiente; em seguida, foram lavadas duas vezes com o tampão fosfato gelado. As células foram permeabilizadas por incubação com tampão fosfato contendo Triton X-100 0,25% à temperatura ambiente por 10 min e lavadas três vezes em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 por 5 min. As células foram, então, incubadas em tampão fosfato 10 mM pH 7,4, contendo albumina sérica bovina 1% e Tween 20 1%, por 30 min para bloquear os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo. Em seguida, as células foram incubadas por 1 h com o anticorpo anti-proteína C associado a surfactante pulmonar, diluído 1:50, no tampão fosfato 10 mM pH 7,4 contendo albumina sérica bovina 1% e Tween 20 1% à temperatura ambiente. As células de pulmão do tipo II foram lavadas três vezes com tampão fosfato por 5 min. Então, foi adicionado o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com Cy3) diluído 1:1000 em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 contendo albumina sérica bovina 1% e Tween 20 1%, e a incubação seguiu por 1 h à temperatura ambiente no escuro. Finalmente, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato por 5 min também no escuro. As células foram analisadas em microscópio confocal Axiovert 100M da Carl Zeiss, Inc. (Jena, Alemanha), com a objetiva no aumento de 20x.

4.12.3 Avaliação da viabilidade das células pulmonares do tipo II no decorrer do tempo - curva de crescimento

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM, contendo soro fetal bovino 10% e penicilina 1000 U/l em uma garrafa de cultura de 50 ml e mantidas em

estufa a 37°C e CO₂ 5%. Após o crescimento e multiplicação das células epiteliais de pulmão, retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Adicionaram-se 200 µl de tripsina 25 mg/ml, contendo EDTA 6,2 mg/ml e manteve-se a incubação por 15 min a 37°C para que as células descolassem da placa de cultura. Transferiu-se esse material para um tubo tipo Falcon e centrifugou-se por 10 min a 400xg; o sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi suspenso em meio de cultura adequado. Separaram-se 20 µl da suspensão de células para a sua contagem em um microscópio óptico comum, usando-se uma Câmara de Neubauer, em pelo menos quatro campos, na presença de Azul de trypan. Para os experimentos foram usadas 5x10⁵ células em cada poço de 60 mm. De 24 em 24 h, por 15 dias, as células de um poço eram tratadas com tripsina, como descrito acima e contadas. Esses experimentos foram feitos em triplicata.

4.12.4 Avaliação da ação de EN nas células do epitélio pulmonar do tipo II

Para se avaliar a ação da EN nas células de pulmão, foi feita uma curva de efeito da dose, usando-se concentrações crescentes de EN.

As células foram cultivadas de acordo com o protocolo descrito acima e, após tratamento com tripsina, foram separadas 5x10⁵ células em cada poço de 60 mm (6 poços) ou 5x10² células em cada poço de 0,8 mm (96 poços). Após 24 h, o meio DMEM foi trocado e, após mais 24 h, foi aplicada a EN em diferentes concentrações (0-160 nM). Após 24 horas as células foram avaliadas quanto a sua viabilidade, proliferação celular e fragmentação nuclear. Esses experimentos foram feitos duas vezes em triplicata.

4.12.5 Avaliação da proliferação celular

Primeiramente, construiu-se a curva padrão de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol (MTT) em relação à concentração de células. Para isso, diferentes concentrações de células (1,0 x 10² – 1,0 x 10⁵) foram aplicadas em placas de 96 poços. Após dois dias, parte dessas células foi tratada com tripsina para contagem com azul de trypan e a outra parte foi submetida ao tratamento com MTT. Essa dosagem foi feita em triplicata e o gráfico foi construído com dados obtidos da contagem de células, para a concentração celular e leitura de MTT. Para avaliar a proliferação celular, foram aplicadas 5,0 x 10² células em cada poço e, após 24 h, as células receberam EN em diferentes concentrações (0-160 nM) ou estaurosporina em diferentes concentrações

(0-2 μM), sendo ambos diluídos em meio sem soro. Após 24 h, foram adicionados 10 μl de MTT 5 mg/ml e após 4 h de incubação a 37°C e CO₂ 5%, o sobrenadante foi retirado e 100 μl de DMSO foram adicionados. A placa foi gentilmente agitada e após 5 min fez-se a leitura da absorbância em 570 nm.

4.12.6 Avaliação da viabilidade e fragmentação nuclear

A viabilidade celular após incubação com EN ou estaurosporina foi avaliada por citometria de fluxo, usando-se o iodeto de propídio (método já descrito).

Para a avaliação da fragmentação nuclear, o *pellet* foi suspenso em 700 μl de etanol 70% por 2 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 400xg e, finalmente, o *pellet* foi suspenso no tampão fosfato 10 mM pH 7,4, contendo Triton-X 100 0,1%, iodeto de propídio 20 $\mu\text{g/ml}$ e RNAse A 200 $\mu\text{g/ml}$. As amostras foram mantidas no escuro por 30 min a 4°C e, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Para as células tratadas com estaurosporina, clássico indutor de apoptose, foi realizado o mesmo protocolo.

O citômetro (Becton Dickinson, NJ, EUA) equipado com laser de argônio (488 nm) e diodo (633 nm) foi ajustado para o registro das células pelo canal FL-2 ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 623 \text{ nm}$). Foram avaliadas dez mil células por amostra. Os gráficos foram obtidos pelo programa *Cell Quest* e analisados com o auxílio do *software* WinMDI versão 2.8. Os resultados foram expressos em porcentagem de fragmentação de DNA por total de eventos, o que reflete indiretamente morte celular.

5. RESULTADOS

5.1 Expressão dos CeEIs recombinantes

Anteriormente, o fragmento do gene de CeEI já havia sido clonado em vetor de clonagem pGEM-T em bactérias *E. coli* da cepa DH-5 α . Após a confirmação da seqüência de nucleotídeos do DNA de alguns clones tiveram suas seqüências de nucleotídeos traduzidas para aminoácidos, utilizando-se o programa de computador DNAMAN. Os resultados do seqüenciamento demonstraram algumas diferenças de aminoácidos entre dois clones. No entanto, quando as seqüências foram alinhadas pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), ambas apresentavam grande similaridade (99,4%) com as seqüências das proteínas Mpc 20 e *Glycine max* (**FIGURA 1**) que são inibidores de peptidases da família Kunitz SBTI.

Para a expressão dos CeEIs, inicialmente foram transformadas bactérias *E. coli* da cepa BL21(trxB)pLys com os plasmídeos contendo os insertos; porém, não houve expressão dos CeEIs recombinantes. O processo foi, então, repetido com *E. coli* da cepa Rosetta gami, sendo as bactérias selecionadas por resistência à ampicilina, tetramicina, clorofenicol e canamicina. Para confirmar a transformação das colônias e a presença dos fragmentos de DNAs de CeEI, realizaram-se PCRs com oligonucleotídeos específicos para os DNAs de CeEI (**FIGURA 2**).

Colônias resistentes aos quatro antibióticos foram transferidas para o meio líquido e, após atingirem a fase exponencial do crescimento, parte do seu material teve a expressão do inibidor induzida com IPTG (1,0 mM). A expressão dos inibidores recombinantes foi avaliada por SDS-PAGE e atividade inibitória.

A análise em SDS-PAGE mostrou o perfil de proteínas totais do lisado de bactérias induzidas e não induzidas; porém, nas colônias induzidas, as bandas predominantes foram de aproximadamente 23 kDa, correspondentes aos CeEIs recombinantes. Nesses mesmos géis, foi possível verificar que as colônias 4-B da **FIGURA 3-A** e 5-A da **FIGURA 3-B** apresentavam maiores quantidades de CeEIs recombinantes, em comparação com as outras colônias, após indução (**FIGURAS 3**); sendo assim, as proteínas expressas por essas colônias foram denominadas rCeEI-4 e rCeEI-5, respectivamente.

Após os testes de inibição de elastase de neutrófilos e a análise em SDS-PAGE, as colônias que apresentaram maior expressão foram escolhidas para expressão em escala preparativa.

5.2 Purificação dos CeEIs recombinantes

5.2.1 Cromatografia de afinidade dos CeEIs recombinantes

Após as expressões dos CeEIs por *E. coli* cepa Rosetta gami, as bactérias foram centrifugadas e o *pellet* das mesmas foi lisado e centrifugado; os sobrenadantes resultantes, contendo rCeEI-4 e rCeEI-5, foram separadamente submetidos a cromatografias de afinidade em colunas de Ni-Sepharose. Os perfis de eluição de rCeEI-4 e rCeEI-5 das cromatografias estão mostrados na **FIGURA 4**. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente entre as frações 36 e 40 para rCeEI-4 (**FIGURA 4-A**) e entre as frações 34 e 50 para rCeEI-5 (**FIGURA 4-B**).

5.2.2 Cromatografia de troca iônica dos CeEIs recombinantes

O *pool* das frações com maior atividade inibitória sobre EN foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF em sistema de FPLC. Os perfis de eluição estão mostrados na **FIGURA 5**. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente nas frações de 20 a 27 para rCeEI-4 e de 25 a 33 para rCeEI-5.

CeEI-4	FVVDTEENLMQNGGSYYILPVIRG
CeEI-5	FVVDTEGNLMQNGGSYYILPVMRG
Mcp20	MKSTTSLALFLLCALTSSYLPSATADIVFDTEGNPIRNGGTYVLPVIRG
Glycine max	MKSTTSVALFLLCALTSSYLPSTA-DIVFDTEGNPIRNGGTYVLPVIRG
	P1 P1'
CeEI-4	KGGGLGLDKTGNETCPIISVVQSPFDTEHGLPVRIASPYLILNIYEGLP
CeEI-5	RGGGLGLDKTGNETCPIISVVQSPYETEHGLPVRIASPYLILNIYEGLP
Mcp20	KGGGIEFAKTETETCPLTVVQSPFEVSKGLPLIISSPFKILDITEGLI
Glycine max	KGGGIEFAKTETETCPLTVVQSPFEVSKGLPLIISSPFKILDITEGLI
CeEI-4	LSLAFTAVPTCAETPSQWTVV-EDLPTGKSLKLSGFYDNAMSGWFNIQ
CeEI-5	LSLAFTAVPTCAETPSQWTVV-EDLPTGKSLKLSGFYDNNLTGWFKIQ
Mcp20	LSLSFTYVPPCASTPSRWTVILKGLPEELHVKLTG-YKNTIDGWFRIQ
Glycine max	LSLSFTYVPPCASTPSRWTVILKGLPEELHVKLTG-YKNTIDGWFRIQ
CeEI-4	K---YANDYKLTFCPRD-SDTCGDVGVNVDENGVRQMVVD-EANG
CeEI-5	K---YNNDYKLTFCALN-SATCGDVGVNVDENGVRQMVVG-EANG
Mcp20	R-SSESNEYKLVFCTSNDDSSCGDIVAPIDREGNRPLIVTHDQNH
Glycine max	RASSESNEYKLVFCTSNDDSSCGDIVAPIDREGNRPLIVTHDQNH
CeEI-4	PLLVMFKK--ATESSANIKLRGAI
CeEI-5	PLLVMFKK--ATESSTNIKLRGAI
Mcp20	PLLVQFQKVEAYESS
Glycine max	PLLVQFQKVEAYESS

FIGURA 1: Comparação de seqüências de aminoácidos de CeEIs e outros inibidores de tripsina.

CeEI-4 - inibidor putativo de EN de *C. echinata*

CeEI-5 - inibidor putativo de EN de *C. echinata*

Mcp20 - inibidor de tripsina de *Matricaria chamomilla*. No. de acesso: 18143655;

Glycine max - inibidor de tripsina p20 de *Glycine max*. No. de acesso: 5381209.

Os aminoácidos idênticos estão mostrados em vermelho e os equivalentes em azul. Os resíduos de cisteína estão destacados em amarelo. Destacados em azul, estão os aminoácidos das posições P1 e P1' dos CeEI-4 e CeEI-5.

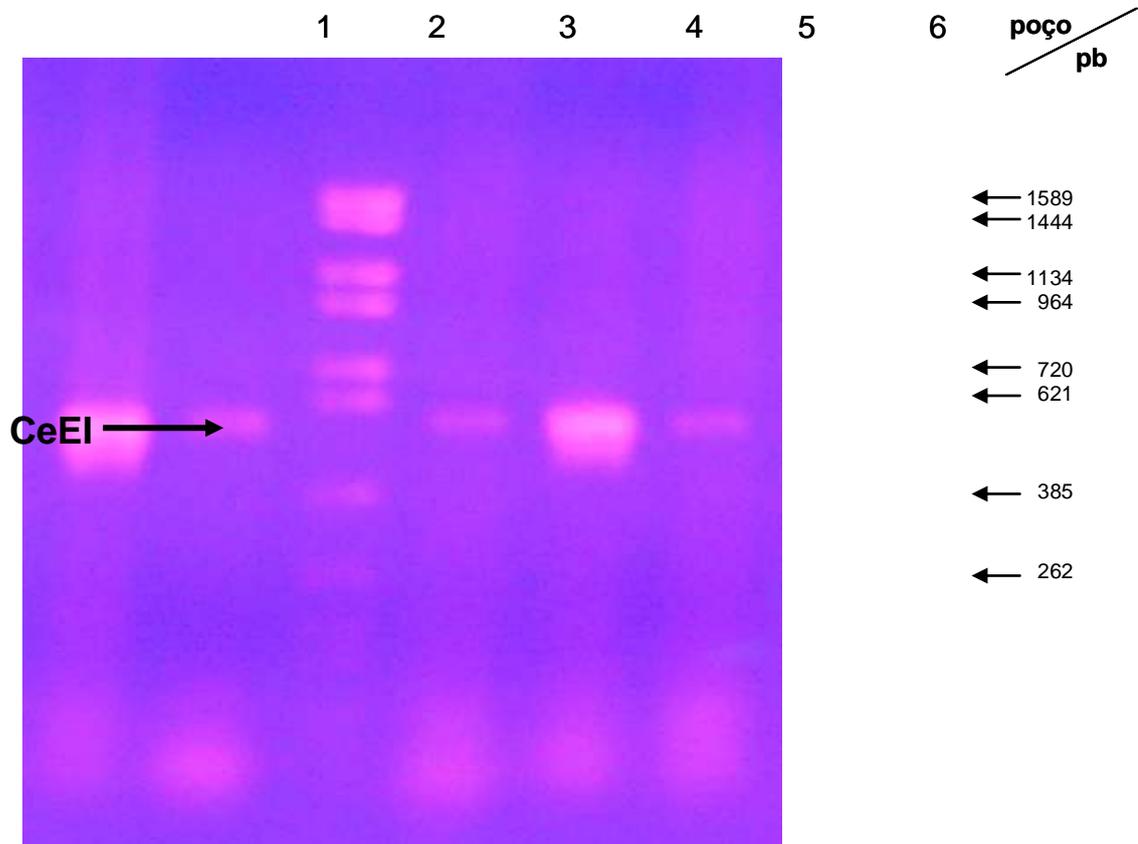


FIGURA 2: Gel de agarose (1,2%) para verificação das transformações das colônias de *E. coli* cepa Rosetta gami.

poço 1: DNA amplificado por PCR da colônia 5-A;

poço 2: DNA amplificado por PCR da colônia 5-B,

poço 3: padrões de pares de bases;

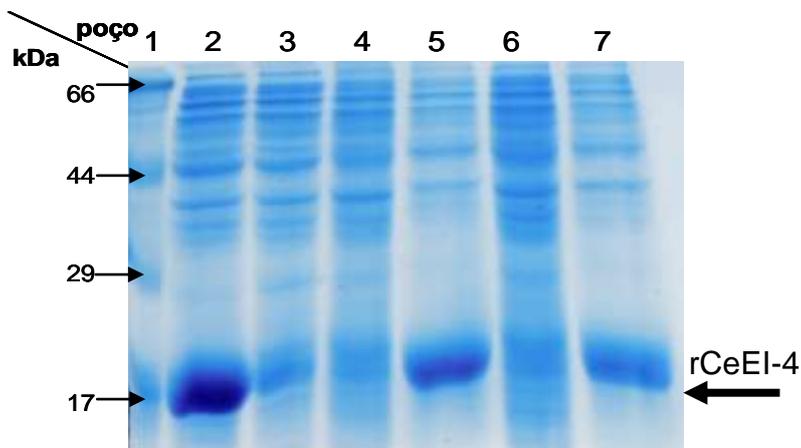
poço 4: DNA amplificado por PCR da colônia 4-A;

poço 5: DNA amplificado por PCR da colônia 4-B;

poço 6: DNA amplificado por PCR da colônia 4-C

Os genes do CeEI apresentaram aproximadamente 600 pares de bases.

A)



B)

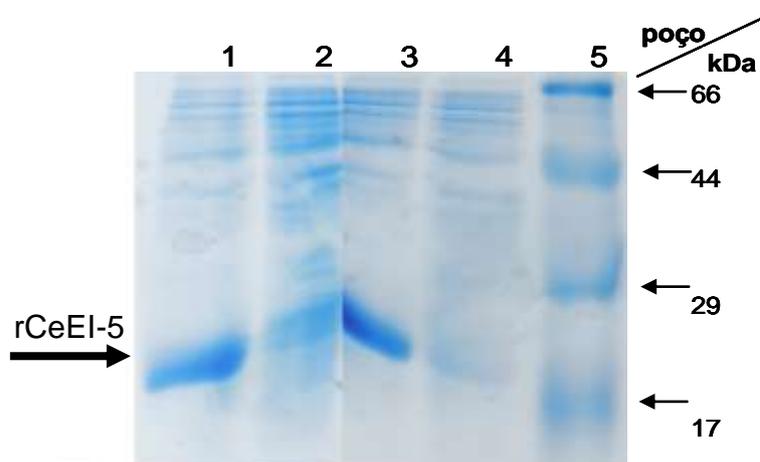


FIGURA 3: SDS-PAGE (12%) das proteínas de lisado de bactérias contendo o cDNA de rCeEI-4 e rCeEI-5.

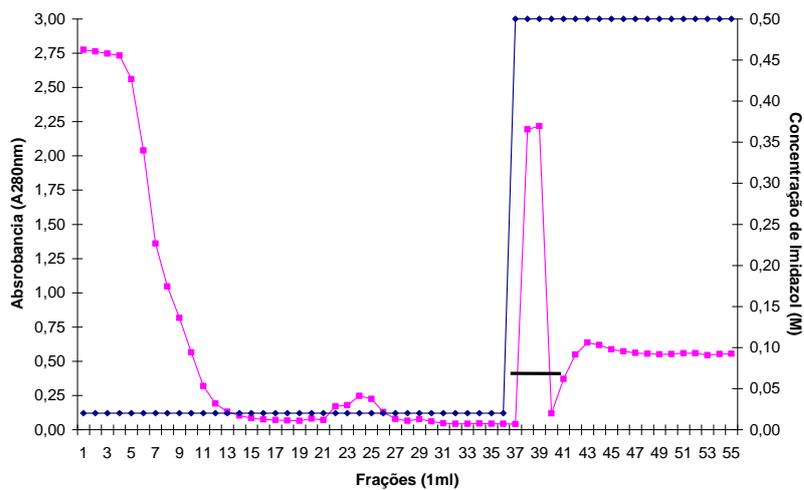
A) Proteínas resultantes da lise de bactérias das colônias 4 A, B e C. Poço 1: padrão de massas moleculares de proteínas; poço 2: colônia 4-B induzida; poço 3: colônia 4-B não induzida; poço 4: colônia 4-A não induzida; poço 5: colônia 4-A induzida; poço 6: colônia 4-C não induzida; poço 7: colônia 4-C induzida.

B) Proteínas resultantes da lise de bactérias das colônias 5 A e B. Poço 1: colônia 5-B induzida; poço 2: colônia 5-B não induzida; poço 3: colônia 5-A induzida; poço 4: colônia 5-A não induzida; poço 5: padrão de massas moleculares.

Coloração das proteínas pela metodologia de Comassie Blue

As colônias 4-B e 5-A induzidas expressaram a maior quantidade do CeEI recombinante, sendo as proteínas expressas foram, respectivamente, denominadas de rCeEI-4 e rCeEI-5.

A)



B)

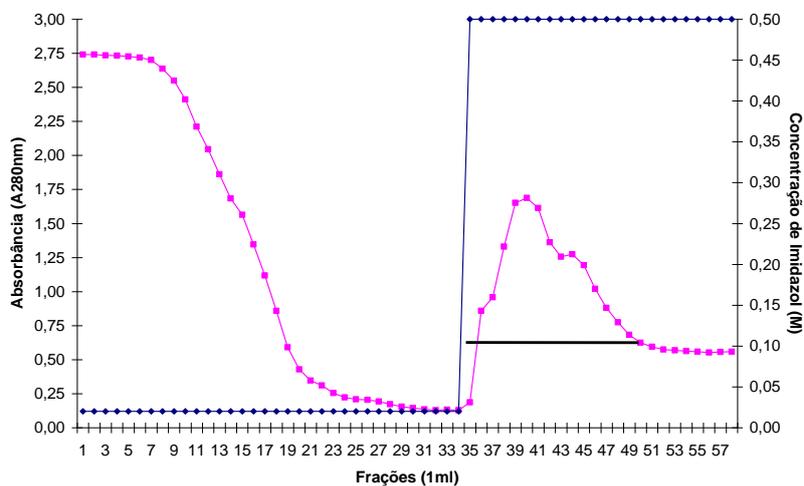


FIGURA 4: Cromatografias de afinidade em coluna Ni-Sepharose dos CeEIs recombinantes.

Tampão de equilíbrio: Tris 20 mM pH 7,5, contendo NaCl 0,30 M

Amostra: sobrenadante resultante da lise das bactérias. A) rCeEI-4 e B) rCeEI-5

Eluição: step wise com imidazol 20 mM e 0,50 M, em tampão Tris 20 mM pH 7,5, contendo NaCl 0,30 M.

As barras indicam as frações que apresentaram maiores atividades inibitórias sobre EN.

A maior atividade inibitória sobre elastase foi encontrada nas frações: A) 36 a 40 e B) 34 a 50.

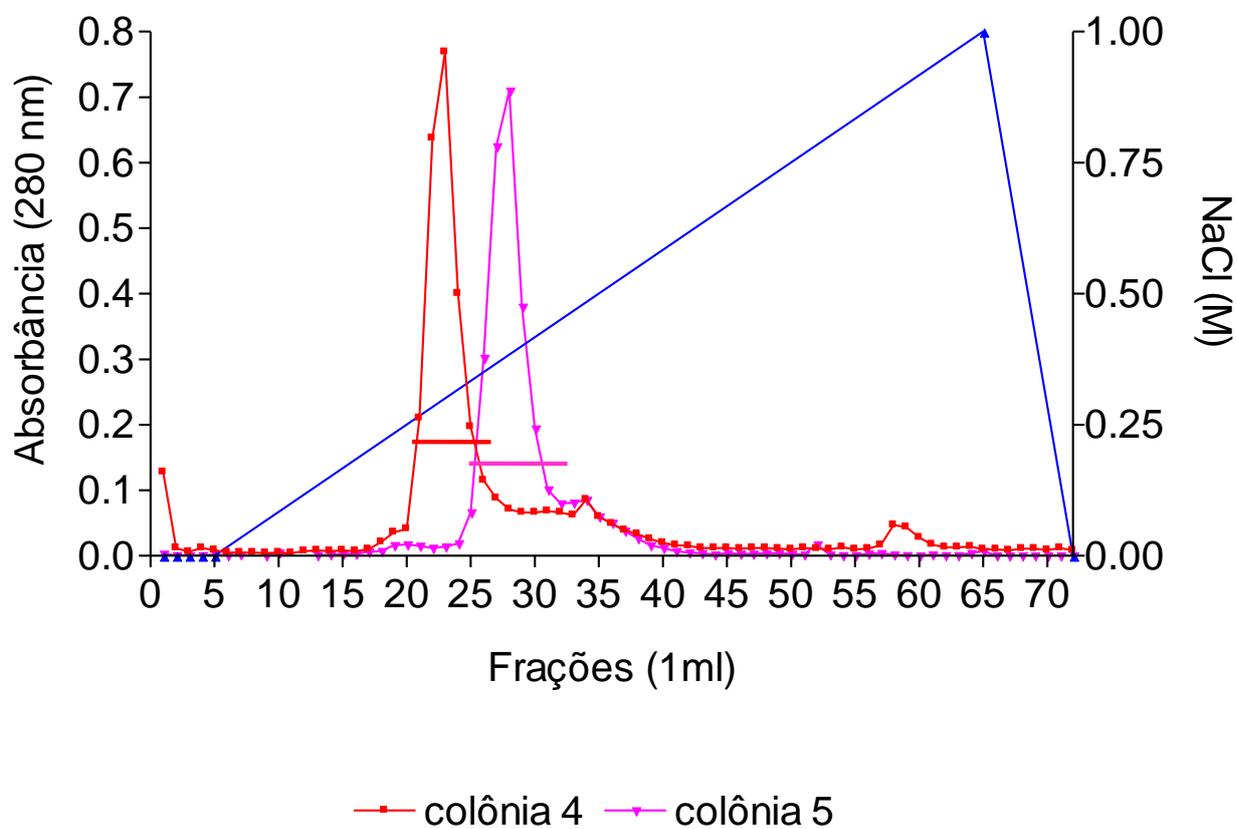


FIGURA 5: Cromatografias de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF dos CeEIs recombinantes.

Tampão de equilíbrio: Tris 50 mM pH 8,0

Amostras: pool das frações 36 a 40 de rCeEI-4 e 34 a 54 de rCeEI-5 eluídas da coluna de Ni-Sepharose, com tampão contendo imidazol 0,50 M, dialisado

Fluxo: 1,0 ml/min

Eluição: 0 a 100 % de NaCl 1M, em 60 min

As barras indicam as frações que apresentaram maiores atividade inibitória sobre EN.

A maior atividade inibitória sobre EN foi encontrada nas frações: rCeEI-4 de 20 a 27 e rCeEI-5 de 25 a 33.

5.3 Caracterização dos CeEIs recombinantes

5.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Por SDS-PAGE, pode-se mostrar a eficiência obtida nas etapas de purificação das proteínas recombinantes; após a cromatografia de troca iônica, os rCeEIs apresentaram-se puros com somente uma banda de proteína com massa molecular de aproximadamente 23 kDa. O rCeEI-4 apresentou massa molecular um pouco maior do que o rCeEI-5 (**FIGURA 6**).

5.3.2 Determinação da atividade inibitória sobre diferentes serinopeptidases

Os CeEIs recombinantes não foram capazes de inibir subtilisina A ou EP; porém, inibiram fortemente EN (**FIGURA 7**), quimotripsina, Cat G, HuPK e tripsina.

5.3.3 Determinação das constantes inibitórias (K_i)

Ensaando-se uma solução padronizada de EN com CeEI em diferentes concentrações, foi possível determinar as constantes inibitórias dos dois inibidores recombinantes. As constantes inibitórias para EN e HuPK foram semelhantes para as duas colônias. Entretanto, em relação à quimotripsina, à Cat G e à tripsina o rCeEI-4 apresentou um K_i cerca de 4 a 8 vezes melhor do que o rCeEI-5, conforme mostrado na **TABELA I**.

5.4 Estudos cinéticos do comportamento da EN

Antes de se determinar o tipo de inibição dos inibidores recombinantes, alguns parâmetros cinéticos da enzima foram determinados. Assim, nas **FIGURAS 8 e 11**, na reação entre EN com substrato o MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan, determinaram-se a constante de dissociação do complexo enzima-substrato ($K_m = 0,08$ mM), o $V_{m\acute{a}x}$ ($5,7 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$), o k_{cat} ($15,5 \text{ s}^{-1}$) e a eficiência catalítica ($120 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que se mostraram similares aos descritos na literatura (Nakajima *et al.*, 1979); variando-se as concentrações de rCeEI-4 ou de rCeEI-5 obteve-se o valor de K_i de $(0,67 \pm 0,05)$ nM ou $(0,8 \pm 0,1)$ nM, respectivamente.

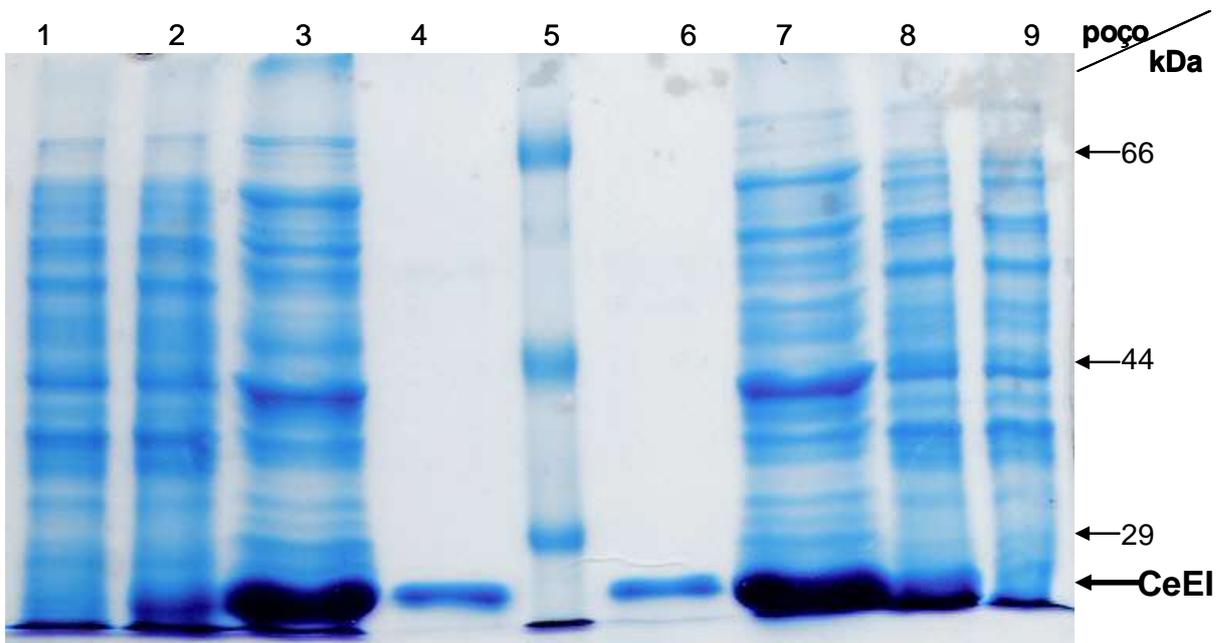


FIGURA 6: SDS-PAGE (12%) dos CeEIs recombinantes nas diferentes etapas de purificação.

Amostras: amostras dialisadas de todas as etapas de purificação dos CeEIs recombinantes.

poço 1: colônia 4 não induzida;

poço 2: colônia 4 induzida;

poço 3: rCeEI-4 eluído com 0,50 M de imidazol da Ni-Sepharose;

poço 4: rCeEI-4 *pool* do material eluído da Hi Trap Q-FF;

poço 5: padrão de massas moleculares;

poço 6: rCeEI-5 eluído da Hi Trap Q-FF;

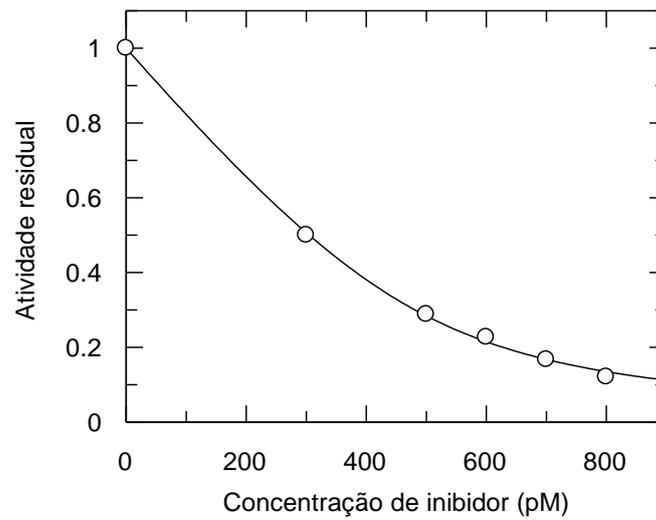
poço 7: rCeEI-5 eluído com 0,50 M de imidazol da Ni-Sepharose;

poço 8: colônia 5 induzida;

poço 9: colônia 5 não induzida.

Os CeEIs recombinantes apresentaram massas moleculares de aproximadamente 23 kDa.

A)



B)

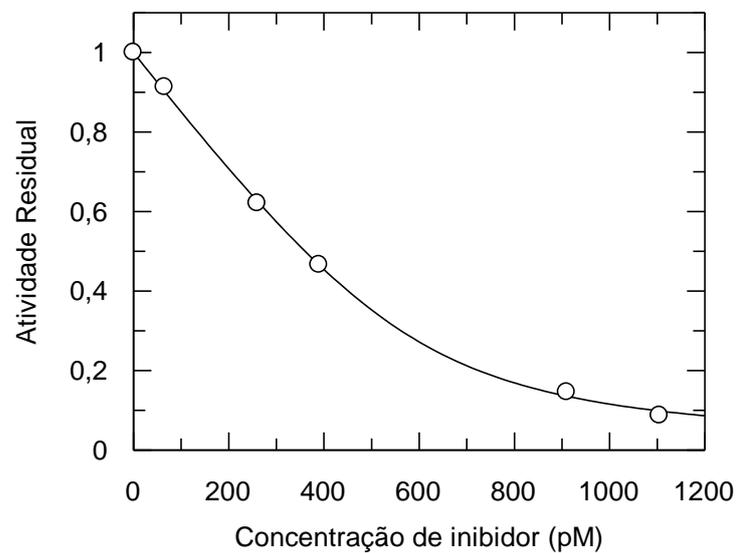


FIGURA 7: Curvas de inibição de EN por rCeEI-4 e rCeEI-5.

EN titulada foi incubada com CeEIs recombinantes em diferentes concentrações, em tampão Tris 50 mM pH 8,0, por 10 min a 37°C; logo após, o substrato MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan foi adicionado e sua hidrólise foi acompanhada pela leitura da absorbância em 405 nm. As constantes de dissociação (K_i) foram calculadas segundo a equação de Morrison.

A) K_i rCeEI-4 = 0,67 nM e B) K_i rCeEI-5 = 0,80 nM.

TABELA I: Constantes de dissociação dos inibidores recombinantes para diferentes serinopeptidases.

Enzima	Substrato	K _i (nM)	
		rCeEI-4	rCeEI-5
Elastase de neutrófilo humano (1,00 nM)	MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan (0,20 mM)	0,67	0,80
Catepsina G (340 nM)	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (0,30 mM)	6,54	52,8
Caliceína plasmática humana (1,00 nM)	H-D-Pro-Phe-Arg-pNan (0,50 mM)	1,00	1,10
Quimotripsina bovina (230 nM)	Suc-Phe-pNan (1,00 mM)	31,2	145
Tripsina bovina (40,0 nM)	H-D-Pro-Phe-Arg-pNan (0,50 mM)	50,0	200
Elastase pancreática de porco (45,0 nM)	Suc-Ala-Ala-Ala-pNan (0,50 mM)	n.i.	n.i.
Subtilisina A (50,0 nM)	Boc-Gly-Gly-Leu-pNan (0,20 mM)	n.i.	n.i.
Caliceína renal humana (8,00 nM)	Val-Leu-Lys-pNan (0,50 mM)	n.i.	n.i.

A inibição das enzimas por rCeEI foi medida por atividade residual e expressa em relação à hidrólise promovida na ausência do inibidor. A constante inibitória (K_i) foi calculada, assumindo-se um mecanismo do tipo *slow tight-binding* e a formação de um complexo (EI), na proporção de 1:1 entre enzima e inibidor, segundo o modelo de Morrison (1982).

n.i. não inibida.

Para elastase pancreática de porco e subtilisina A as concentrações máximas de inibidor foram [rCeEI-4]_{máx}= 368 nM e [rCeEI-5]_{máx}= 416 nM; para caliceína renal humana, [rCeEI-4]_{máx}= 184 nM e [rCeEI-5]_{máx}= 208 nM.

5.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos e do tipo de inibição da EN pelo rCeEI-4

Na **FIGURA 8**, verifica-se que as retas obtidas com as diferentes concentrações de rCeEI-4 convergem para o quadrante II, muito próximo ao eixo Y. Além disso, o *replot* das inclinações das retas pelas concentrações de CeEI-4 é representado por uma hipérbole, e os valores invertidos ($1/\Delta$ inclinação das retas $\times 1/[CeEI-5]$) são representados por uma reta (**FIGURA 9**). Fazendo-se o gráfico dos interceptos das curvas obtidas no gráfico anterior com o eixo Y $\times [rCeEI-4]$, obteve-se uma reta paralela ao eixo X o que configura $\beta=1$ (**FIGURA 10**). Com esses gráficos, conseguiu-se calcular a constante de dissociação aparente do inibidor ($K_i=0,67$ nM), o parâmetro de perturbação de K_s ($\alpha=10,6$) e o parâmetro de perturbação do k_{cat} ($\beta=1$). Esses valores ($1 < \alpha < \infty$ e $\beta=1$) são compatíveis com o comportamento clássico de inibidores mistos parciais (Segel, 1993).

5.4.2 Determinação dos parâmetros cinéticos e do tipo de inibição da EN pelo rCeEI-5

Para o rCeEI-5, as retas obtidas com as diferentes concentrações do inibidor também convergiram para o quadrante II, mas próximo ao eixo X (**FIGURA 11**). Porém, os *replots* das inclinações das retas pelas concentrações de rCeEI-5 e dos interceptos com o eixo Y pelas concentrações de rCeEI-5 são representados por hipérbolas, cujos valores invertidos formam retas (**FIGURA 12**), indicando nesse caso $\beta \neq 1$. Pelos gráficos dos inversos ($1/\Delta$ inclinação $\times 1/[rCeEI-5]$ e $1/\Delta$ intercepto $\times 1/[rCeEI-5]$), conseguiu-se calcular a constante de dissociação aparente do inibidor ($K_i=0,8$ nM), o parâmetro de perturbação de K_m ($\alpha=2,5$) e o parâmetro de perturbação do k_{cat} ($\beta=0,6$). Esses dados também são compatíveis com o comportamento clássico de inibidores mistos parciais (Segel, 1993).

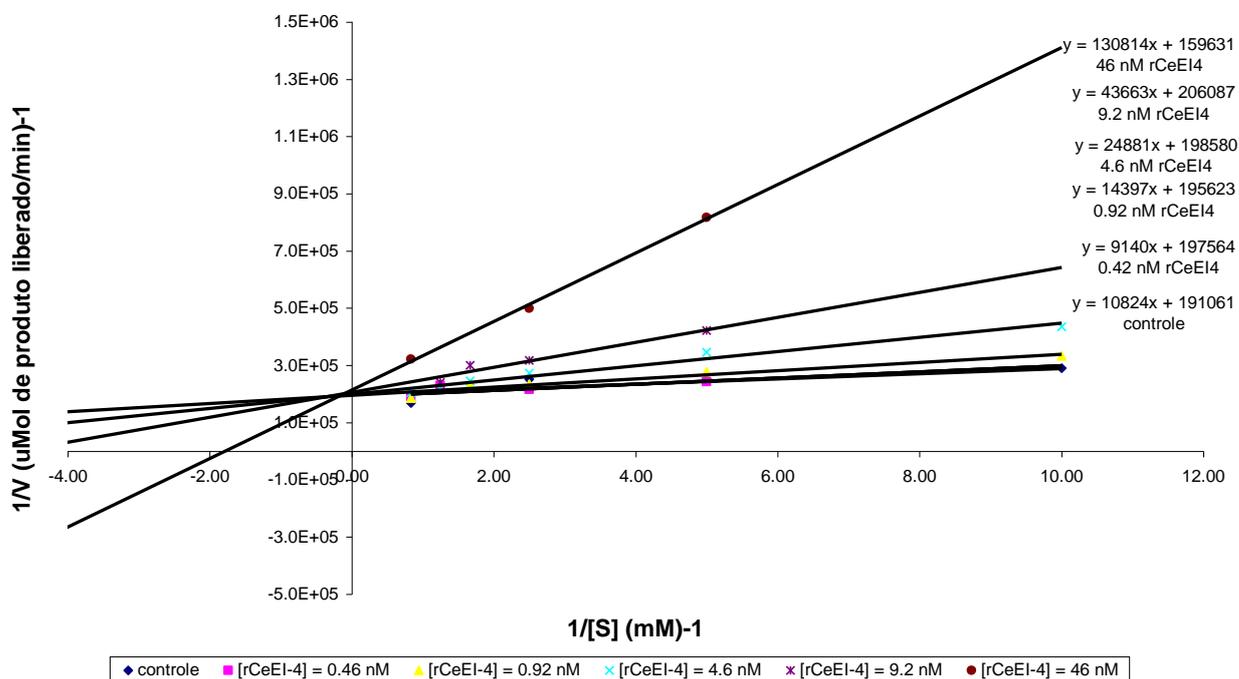


FIGURA 8: Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise do MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan por EN e da constante de inibição pelo rCeEI-4.

Variando-se a concentração do MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan e do rCeEI-4, e com o auxílio do programa EXCEL de computador, estabeleceram-se os parâmetros cinéticos da hidrólise do substrato pela enzima.

$$K_m = (0,08 \pm 0,02) \text{ mM}$$

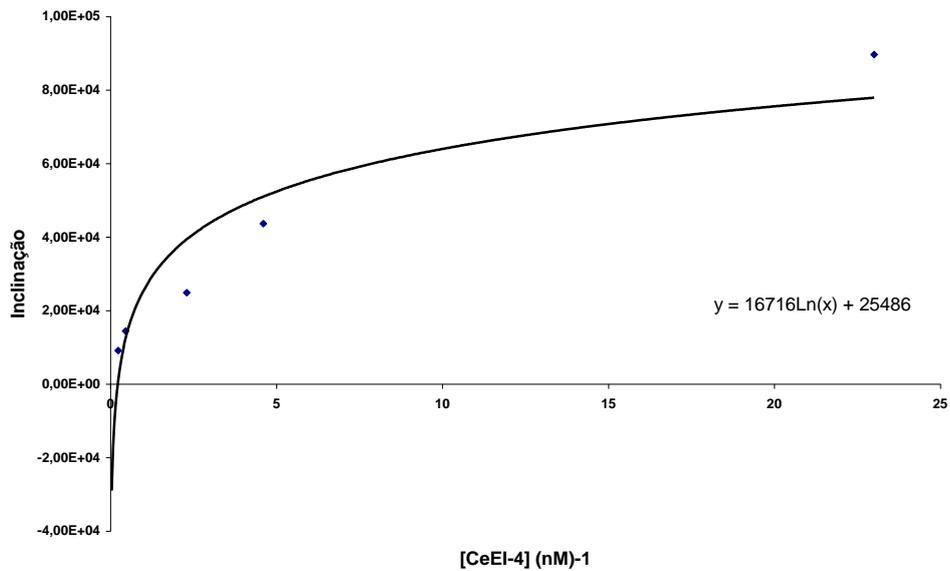
$$V_{\text{máx}} = (5,7 \pm 0,2) \mu\text{M}/\text{min}$$

$$k_{\text{cat}} = (9,6 \pm 1,4) \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_m = 120 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$K_i = (0,67 \pm 0,05) \text{ nM}$$

A)



B)

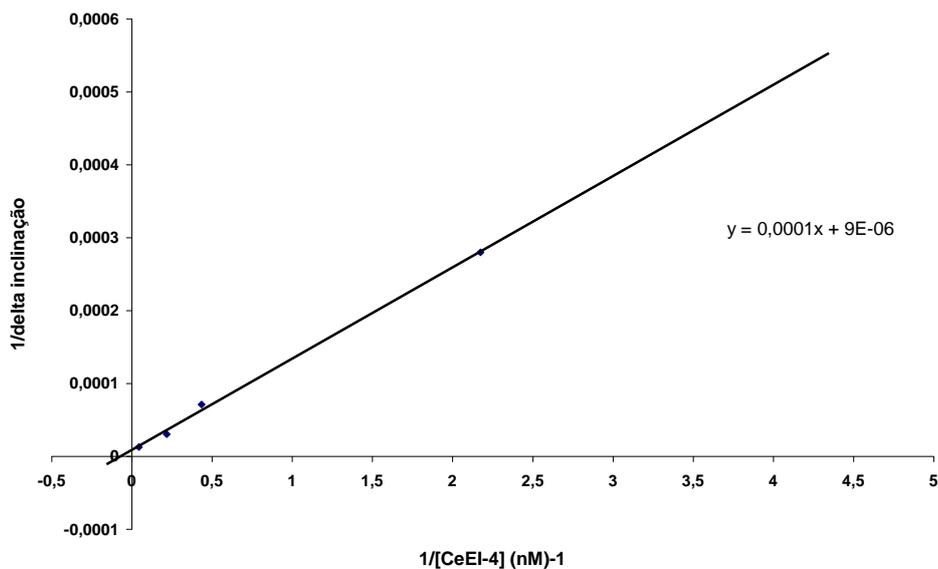


FIGURA 9: Determinação do valor de α para inibição da EN pelo rCeEI-4.

Com as equações das retas da **FIGURA 8** obtiveram-se a inclinação das retas e o delta das inclinações. Pela equação descrita em MÉTODOS, calculou-se o valor de α . Como $1 < \alpha < \infty$, tem-se uma inibição mista.

A – O replot da inclinação da reta x [rCeEI-4] resulta em uma hipérbole

B – O replot de $1/\Delta$ inclinação x $1/[\text{rCeEI-4}]$ resulta em uma reta

$\alpha = 10,6$

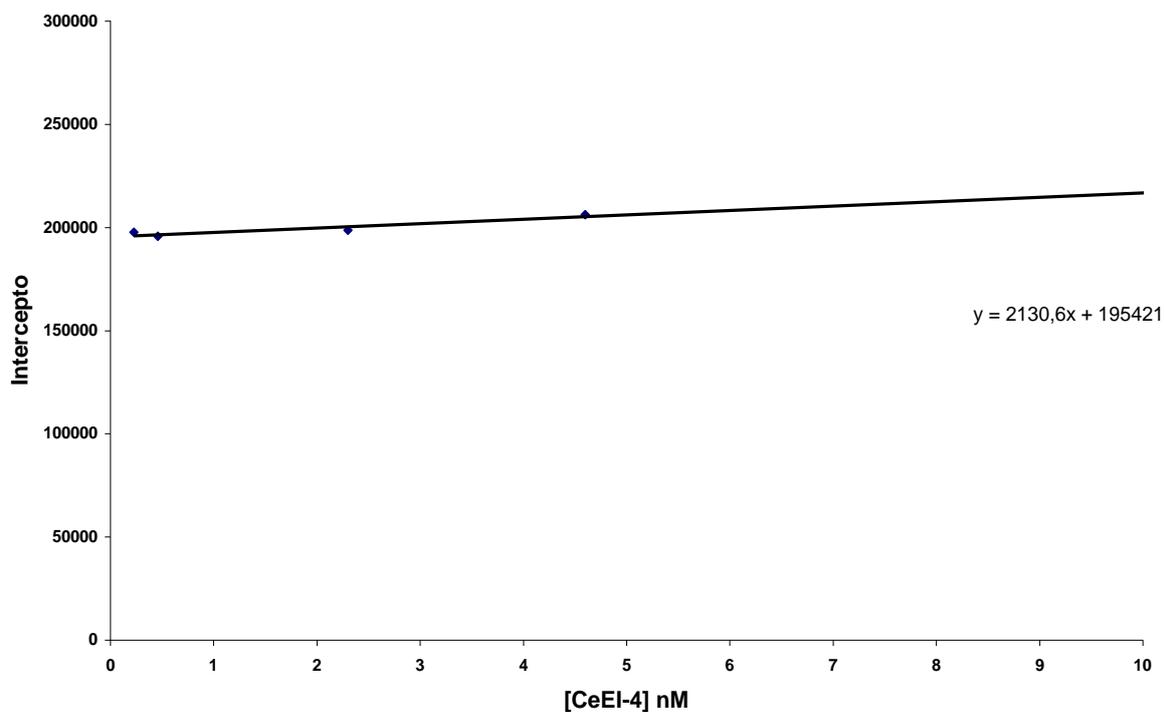


FIGURA 10: Determinação do valor de β para inibição da EN pelo rCeEI-4.

Com as equações das retas da **FIGURA 8**, calculou-se o intercepto no eixo Y e o delta dos interceptos. Pela equação descrita em MÉTODOS, calculou-se o valor de β . Como a reta é paralela ao eixo x, tem-se que β é aproximadamente 1, o que indica uma inibição mista parcial.

$$\beta = 1$$

O replot do intercepto x [rCeEI-4] resulta em uma reta paralela ao eixo das abscissas

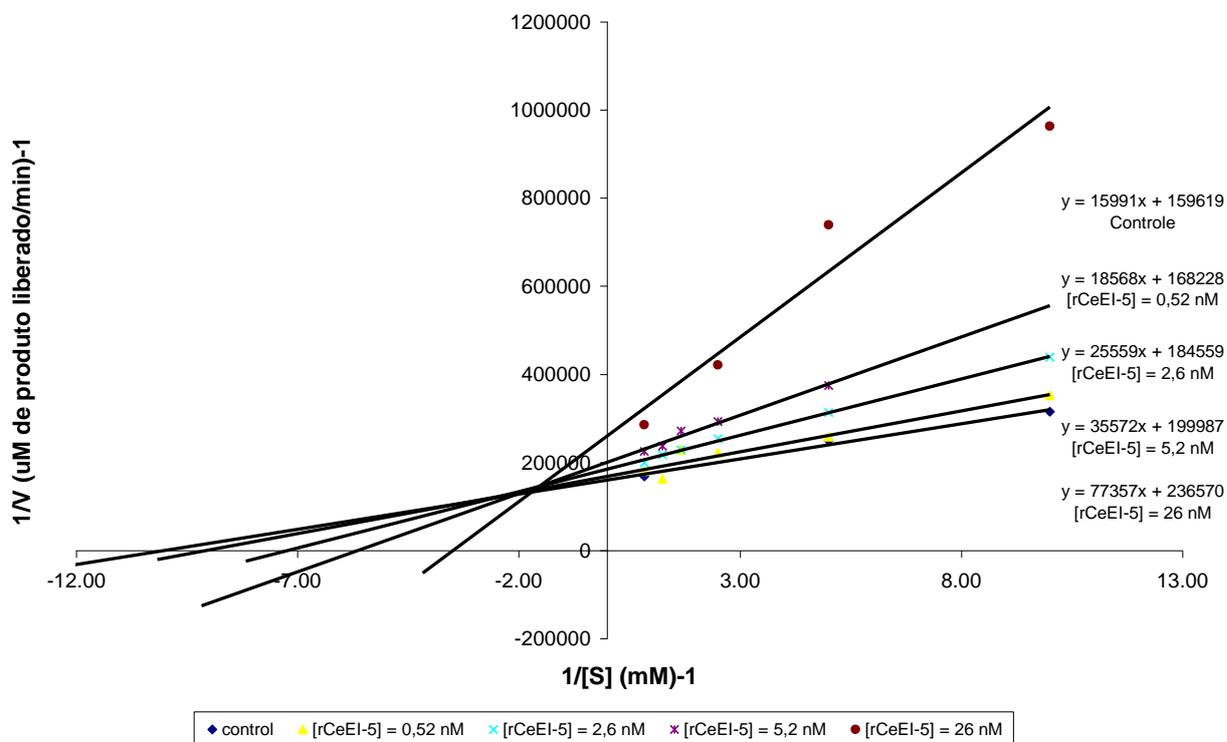


FIGURA 11: Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise do MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan por EN e da constante de inibição da EN pelo rCeEI-5.

Variando-se a concentração do MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan e do rCeEI-5, e com o auxílio do programa de computador EXCEL, estabeleceram-se os parâmetros cinéticos da hidrólise do substrato pela enzima, além da constante de inibição.

$$K_m = (0,08 \pm 0,02) \text{ mM}$$

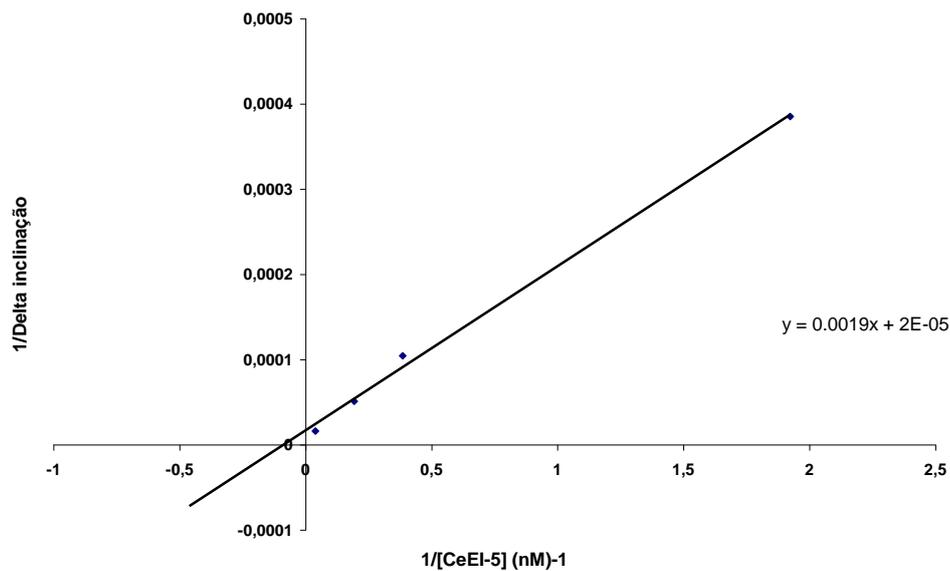
$$V_{\text{máx}} = (5,7 \pm 0,2) \mu\text{M}/\text{min}$$

$$k_{\text{cat}} = (9,6 \pm 1,4) \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_m = 120 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$K_i = (0,8 \pm 0,1) \text{ nM}$$

A)



B)

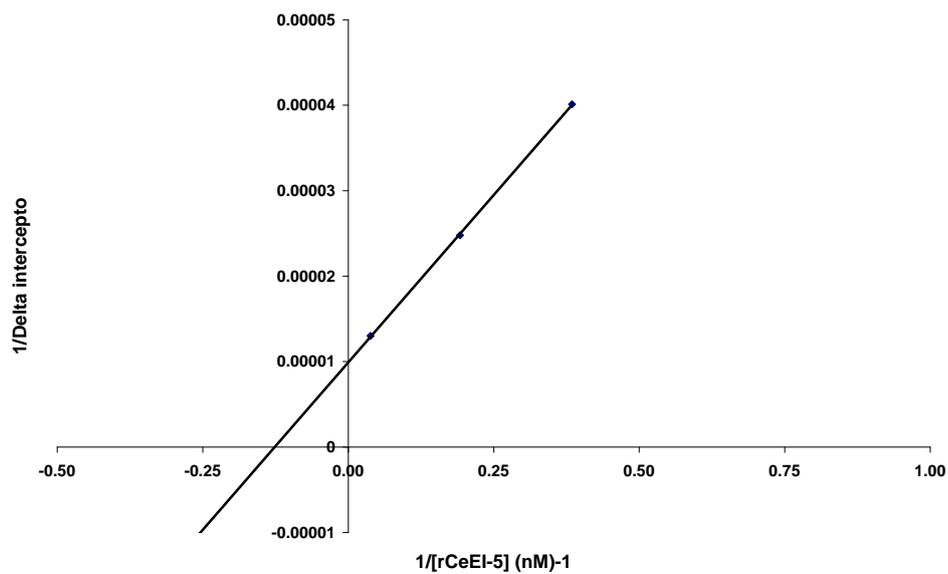


FIGURA 12: Determinação do tipo de inibição da EN pelo rCeEI-5.

Com as equações das retas da **FIGURA 11**, obtiveram-se a inclinação das retas e o delta das inclinações. Pela equação descrita em MÉTODOS, calcularam-se os valores de α e β . Como $1 < \alpha < \infty$, tem-se uma inibição mista e como $0 < \beta < 1$; essa inibição também é classificada como parcial.

A - O replot de $1/\Delta$ inclinação x $1/[rCeEI-5]$ resulta em uma reta

B - O replot de $1/\Delta$ intercepto X $1/[rCeEI-5]$ também resulta em uma reta

$\alpha = 2,5$; $\beta = 0,6$

5.5 Determinação do menor fragmento ativo do inibidor CeEI-4

A seqüência de nucleotídeos obtida para CeEI foi traduzida para aminoácidos, utilizando-se o programa de computador DNAMAN (**FIGURA 13**). Em seguida, foi utilizada a estrutura primária e um modelo da estrutura terciária baseado em homologia para delimitar três fragmentos possivelmente ativos do CeEI, sendo o fragmento 36 delimitado entre os aminoácidos N³⁶ e S⁸⁸, o fragmento 46 entre S⁴⁶ e L⁷⁵ e o fragmento 55 entre P⁵⁵ e L⁷⁵. Na **FIGURA 14** é possível verificar a delimitação na estrutura primária e na estrutura terciária dos fragmentos. O fragmento 36 contém uma ponte de dissulfeto e o sítio reativo, o fragmento 46 não possui a ponte de dissulfeto, mas o sítio reativo. O fragmento 55 possui menos aminoácidos e contém o sítio reativo.

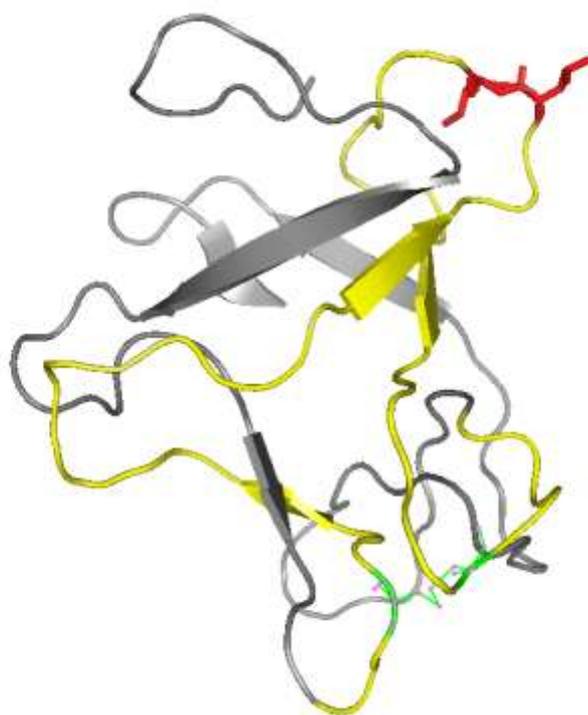
De posse dos fragmentos, as sequencias de aminoácidos dos mesmos foram analisadas, utilizando-se ferramentas disponíveis no *site* www.expasy.org. Dessa análise, foram obtidos dados importantes para o estudo dos fragmentos, como a quantidade de aminoácidos, a massa molecular com e sem a cauda de histidina e o ponto isoelétrico com e sem a cauda de histidina para os três fragmentos (**TABELA II**).

TTT	TGT	TGT	CGA	CAC	TGA	GGG	GAA	CCT	GAT	GCA	GAA	TGG	CGG	TTC	ATA
F	V	V	D	T	E	G	N	L	M	Q	N	G	G	S	Y
1															16
CTA	CAT	CTT	ACC	AGT	CAT	GAG	AGG	AAG	GGG	TGG	AGG	CCT	TGG	ACT	TGA
Y	I	L	P	V	M	R	G	R	G	G	G	L	G	L	D
17															32
CAA	AAC	TGG	GAA	CGA	AAC	ATG	TCC	CAT	TTC	TGT	GGT	CCA	GTC	TCC	CTA
K	T	G	N	E	T	C	P	I	S	V	V	Q	S	P	Y
33															48
TGA	GAC	CGA	ACA	TGG	CTT	GCC	TGT	GAG	AAT	TGC	ATC	CCC	ATA	CCT	AAT
E	T	E	H	G	L	P	V	R	I	A	S	P	Y	L	I
49															64
TCT	TAA	TAT	CTA	CGA	AGG	CCT	TCC	CTT	GTC	CTT	AGC	ATT	TAC	TGC	AGT
L	N	I	Y	E	G	L	P	L	S	L	A	F	T	A	V
65															80
ACC	AAC	ATG	TGC	CGA	GAC	ACC	TTC	ACA	GTG	GAC	AGT	GGT	TGA	AGA	TTT
P	T	C	A	E	T	P	S	Q	W	T	V	V	E	D	L
81															96
GCC	CAC	TGG	GAA	GTC	TCT	GAA	GCT	CTC	TGG	CTT	CTA	CGA	CAA	CAA	TTT
P	T	G	K	S	L	K	L	S	G	F	Y	D	N	N	L
97															112
GAC	CGG	TTG	GTT	TAA	GAT	TCA	GAA	ATA	TAA	TAA	TGA	CTA	TAA	GCT	TAC
T	G	W	F	K	I	Q	K	Y	N	N	D	Y	K	L	T
113															128
GTT	CTG	TGC	TCT	TAA	CAG	TGC	CAC	TTG	TGG	AGA	TGT	TGG	CGT	TAA	TGT
F	C	A	L	N	S	A	T	C	G	D	V	G	V	N	V
129															144
CGA	TGA	AAA	TGG	AGT	TAG	ACA	GAT	GGT	TGT	GGG	TGA	AGC	AAA	CGG	TCC
D	E	N	G	V	R	Q	M	V	V	G	E	A	N	G	P
145															160
CCT	GCT	TGT	TAT	GTT	CAA	GAA	GGC	CAC	TGA	GTC	TTC	TGC	TAA	TAT	TAA
L	L	V	M	F	K	K	A	T	E	S	S	A	N	I	K
161															176
ACT	TCG	AGG	TGC	TAT	ATA	AAT	TNA	TAA	GAA	TCG	TAG	GAG	CTT	CCA	TCA
L	R	G	A	I	*										
177				181											
TGC	TGT	CTA	TGG	AAA	AGT	GTT	GTA	CTT	TTC	TCA	TAG	ATA	TGT	ACC	CGC
TCT	TNC	TCT	AAA	ATA	AAA										

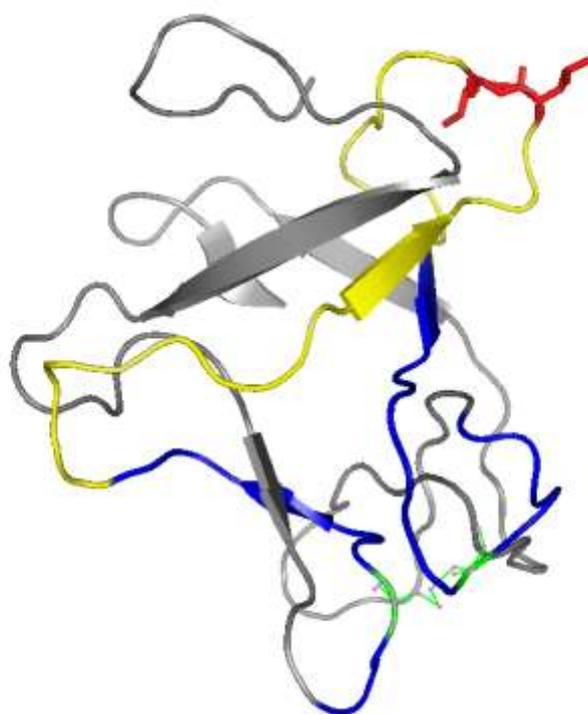
FIGURA 13: Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos traduzidas do DNA do CeEI.

O sinal de poliadenilação está em letras vermelhas sublinhadas e a cauda de poli A está em letras vermelhas. A sequência de aminoácidos do CeEI está mostrada em negrito. O número dos aminoácidos está em azul e o códon de terminação, em verde. Destacados em cinza, estão os aminoácidos obtidos pela seqüência da porção N-terminal da proteína purificada. Destacados em lilás estão os aminoácidos das posições P1 e P1' do inibidor e em amarelo está a parte delimitada para determinação do menor peptídeo ativo.

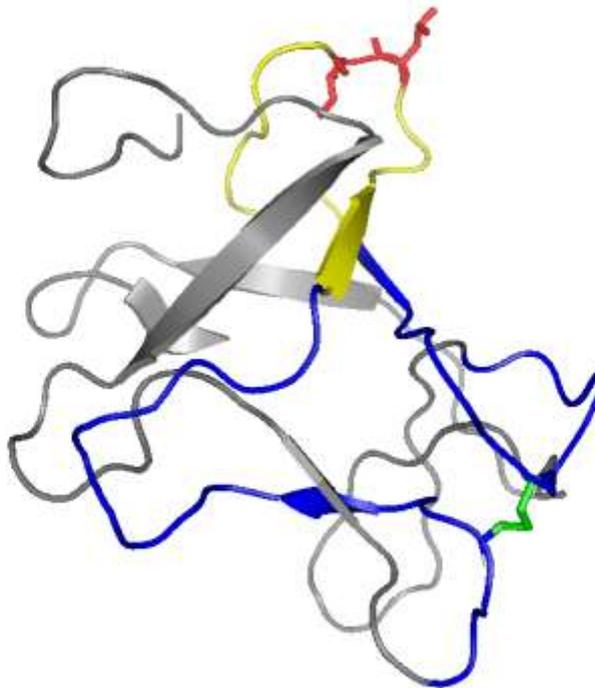
A)



B)



C)



D)



FIGURA 14: O modelo da estrutura terciária e parte da estrutura primária do inibidor CeEI utilizados para delimitar os menores fragmentos ativos do inibidor.

Nas Figuras A, B e C estão representadas as estruturas tridimensionais teóricas dos fragmentos delimitados. Em cinza está o esqueleto carbônico dos aminoácidos que compõem o inibidor íntegro (rCeEI). Em verde está a ponte de dissulfeto e em vermelho, os aminoácidos do sítio reativo do inibidor. Em azul está representado o fragmento 36, o maior dos fragmentos. Em amarelo está o esqueleto carbônico dos aminoácidos que compõe o fragmento do inibidor: A) fragmento 36; B) fragmento 46 e C) fragmento 55.

Em D estão representados os aminoácidos dos fragmentos delimitados. Em azul estão os números dos aminoácidos na proteína inteira. Destacados em lilás estão os aminoácidos P1 e P1' putativos do inibidor e, em vermelho, estão as cisteínas. O fragmento 36 compreende a proteína de N³⁶ até S⁸⁸, o fragmento 46 vai de S⁴⁶ até S⁷⁵ e finalmente o fragmento 55 se localiza de P⁵⁵ até S⁷⁵.

TABELA II: Dados biofísicos teóricos dos fragmentos de aminoácidos de CeEI.

	fragmento 36	fragmento 46	fragmento 55
aminoácidos	53	30	23
massa molecular	5703	3356	2548
mm com cauda de histidina	6595	4248	---
ponto isoelétrico	4.1	4.5	7
ponto isoelétrico com cauda de histidina	4.3	4.7	---

5.6 Clonagem do menor fragmento de DNA de CeEI e expressão do menor peptídeo ativo de rCeEI-4

Depois de confirmada a presença do inserto, o vetor contendo o fragmento foi digerido com as respectivas enzimas de restrição, bem como o plasmídeo de expressão (pET 26b). Os fragmentos de DNA liberados podem ser verificados na eletroforese em gel de agarose mostrada na **FIGURA 15**. Na **FIGURA 15-A**, é destacado o fragmento 36 liberado após digestão com as enzimas de restrição *Bam*H1 e *Xho* I, na **FIGURA 15-B** é destacado o fragmento 46 liberado após a digestão com as mesmas enzimas de restrição.

O segmento de cDNA do fragmento de CeEI inserido no plasmídeo pPIC9K para *Pichia pastoris* foi apenas digerido com a enzima de restrição *Sal* I para a linearização (**FIGURA 15-C**).

A expressão dos fragmentos de CeEI foi avaliada por SDS-PAGE e atividade inibitória. Entretanto, a banda relativa ao fragmento foi fracamente identificada, sendo que a colônia escolhida para a expressão em grande escala foi a que apresentou a maior atividade inibitória (dados não mostrados).

5.7 Purificação dos fragmentos de CeEI recombinantes expressos em bactérias

5.7.1 Purificação do fragmento 36 de CeEI recombinante expresso em bactérias

Após a lise das bactérias e centrifugação, os sobrenadantes contendo o fragmento 36 foram submetidos a cromatografias de afinidade em colunas de Ni-Sepharose. O perfil de eluição do fragmento 36 está mostrado na **FIGURA 16-A**. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente entre as frações 34 e 42. Essas amostras foram unidas em um *pool* que foi submetido a uma filtração em gel para a retirada do imidazol, como pode ser visto na **FIGURA 16-B**. O *pool* das frações eluídas da filtração em gel, com maior atividade inibitória sobre EN foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente nas frações de 45 a 55 (**FIGURA 16-C**). No momento no qual esse *pool* foi submetido à cromatografia de fase reversa, a proteína já não apresentava mais atividade inibitória.

O fragmento apresentou dois picos proteicos principais e com tempos de retenção semelhantes, conforme **FIGURA 16-D**.

5.7.2 Purificação do fragmento 46 de CeEI recombinante expresso em bactérias

Após a lise das bactérias e centrifugação, os sobrenadantes contendo o fragmento 46 foram submetidos a cromatografias de afinidade em colunas de Ni-Sephrose. O perfil de eluição do fragmento 46 está mostrado na **FIGURA 17-A**. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente entre as frações 65 e 72. Essas amostras foram unidas em um *pool* que foi submetido a uma filtração em gel para a retirada do imidazol, como pode ser visto na **FIGURA 17-B**. O *pool* das frações eluídas da filtração em gel, com maior atividade inibitória sobre EN foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente nas frações de 52 a 55 (**FIGURA 17-C**). O *pool* das frações do fragmento 46, com maior atividade inibitória sobre EN, foi submetido a uma filtração em gel em coluna Superdex G-30. O perfil de eluição está mostrado na **FIGURA 17-D**. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente nas frações 79 a 85. No momento no qual esse *pool* foi submetido à cromatografia de fase reversa, a proteína já não apresentava mais atividade inibitória.

Assim como o fragmento 36, o fragmento 46 também apresentou dois picos proteicos principais e com tempos de retenção semelhantes, conforme **FIGURA 18-A**. Foi considerado o pico majoritário de cada fragmento (36 e 46), eluído na cromatografia de fase reversa, para o sequenciamento da porção N-terminal.

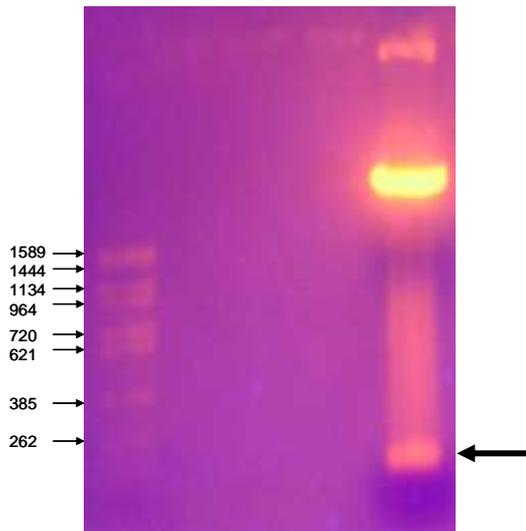
5.7.3 Identificação do fragmento 46 por espectrometria de massa

Na espectrometria de massa foi identificado um pico que pode corresponder ao fragmento 46; entretanto, a quantidade foi insuficiente para sua confirmação (**FIGURA 18-B**).

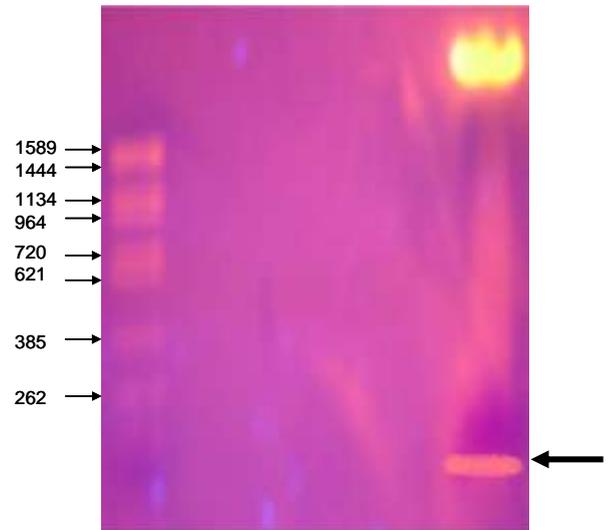
5.7.4 Seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal dos fragmentos de CeEI recombinantes

Os materiais eluídos das cromatografias de fase reversa tiveram seus aminoácidos seqüenciados para confirmação da estrutura primária do peptídeo (**FIGURA 19**).

A)



B)



C)

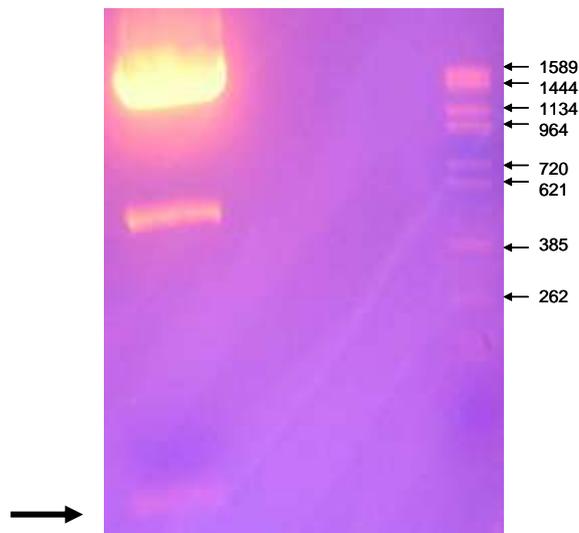


FIGURA 15: Géis de agarose (1%) dos fragmentos de DNA de CeEI, após digestão com enzimas de restrição.

As construções em pGEM-T, contendo os fragmentos de DNA 36 e 46, foram incubadas com enzimas de restrição. A) fragmentos 36 e B) fragmento 46 digeridos com as enzimas *Bam*H1 e *Xho* I C) A construção em pGEM-T contendo o inserto do fragmento 36 para clonagem em vetor pPIC9K foi digerida com as enzimas de restrição *Avr* II e *Sna*B I. As setas indicam os fragmentos de DNA liberados.

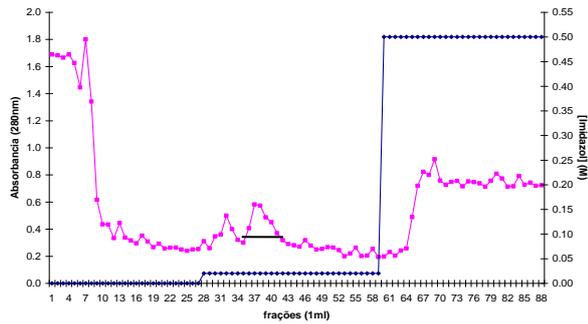
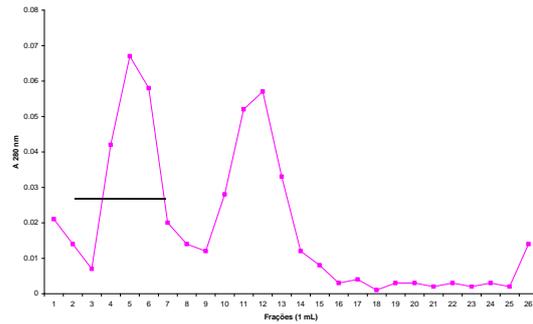
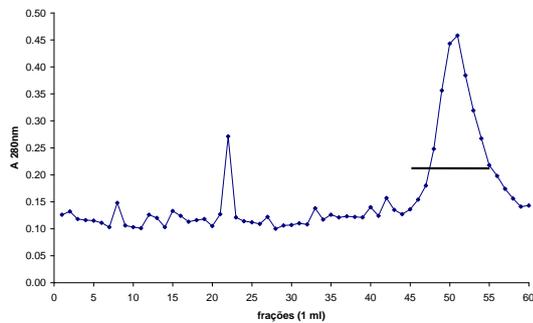
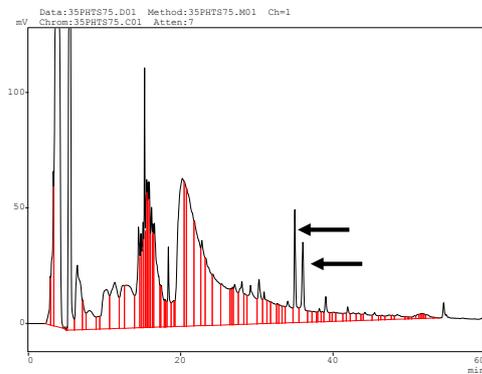
A)**B)****C)****D)**

FIGURA 16: Purificação do fragmento 36 de CeEI expresso em bactérias.

A) o sobrenadante resultante da fração periplasmática das bactérias foi aplicado em uma cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose.

B) o *pool* das frações que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN da etapa anterior foi submetido a uma filtração em gel em coluna PD-10.

C) o *pool* das frações que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN da etapa anterior foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF.

D) o *pool* das frações que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN da etapa anterior foi submetido a uma cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈.

As maiores atividades inibitórias sobre EN foram encontradas nas frações destacadas com uma barra/seta.

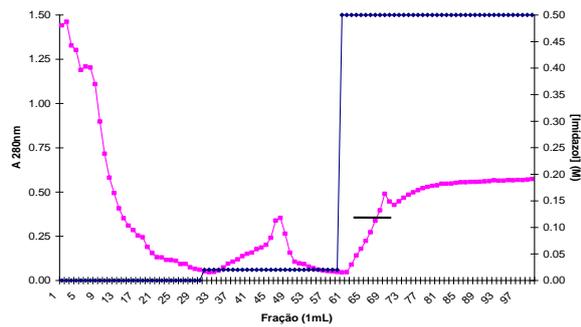
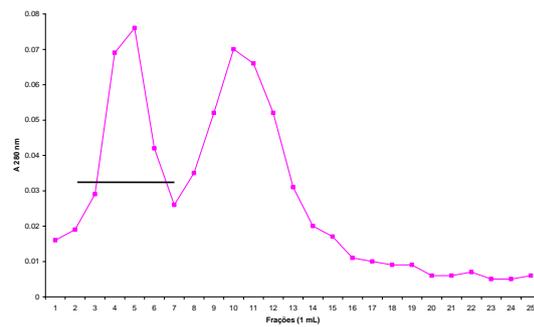
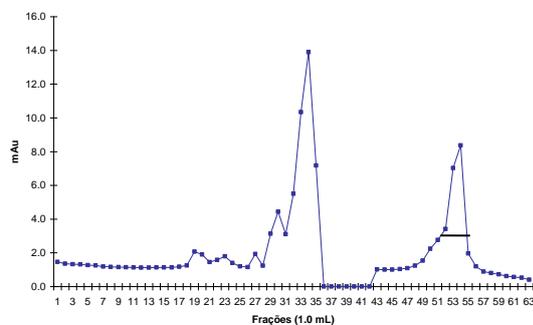
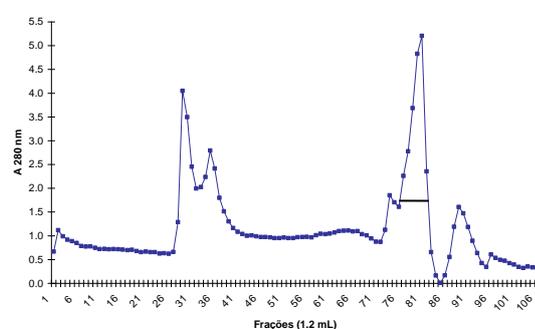
A)**B)****C)****D)**

FIGURA 17: Purificação do fragmento 46 de CeEI expresso em bactérias.

A) o sobrenadante resultante da fração periplasmática das bactérias foi aplicado em uma cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose.

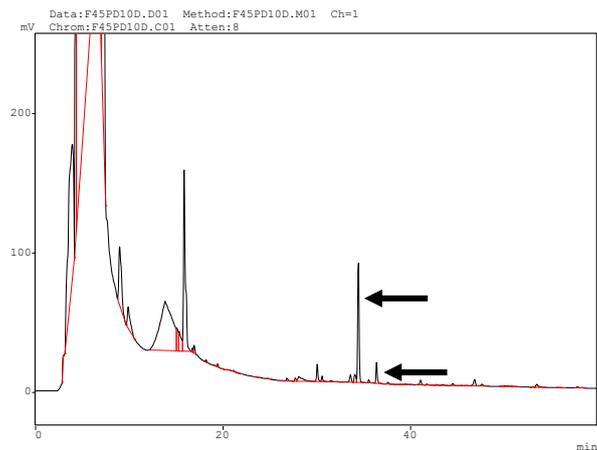
B) o *pool* das frações que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN da etapa anterior foi submetido a uma filtração em gel em coluna PD-10.

C) o *pool* das frações que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN da etapa anterior foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF.

D) o *pool* das frações que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN da etapa anterior foi submetido a uma filtração em gel em coluna Superdex G-30.

As maiores atividades inibitórias sobre EN foram encontradas nas frações destacadas com uma barra.

A)



B)

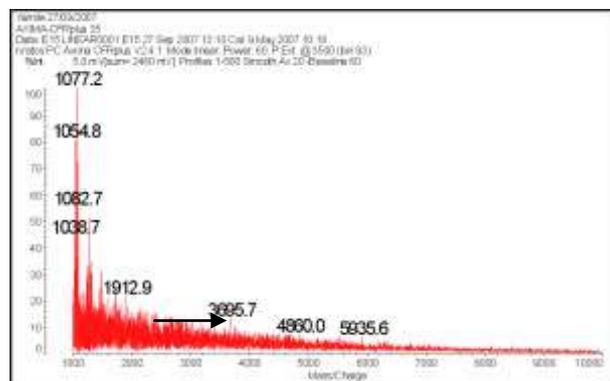


FIGURA 18: Purificação e caracterização do fragmento 46 de CeEI expresso em bactérias.

A) o *pool* das frações eluídas da filtração em gel em coluna Superdex G-30 que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN foi submetido a uma cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈.

B) Espectrometria de massa do fragmento 46 de CeEI.

As maiores atividades inibitórias sobre EN foram encontradas nas frações destacadas com uma seta. Na espectrometria de massa a seta indica a massa correspondente a o fragmento 46 (3695,7)

A)

N E T C P I S V V Q S P Y E T E H G L P
36 46 55

V R I A S P Y L I L N I Y E G L P L S L
75

A F T A V P T C A E T P S
88

B)

S P Y E T E H G L P V R I A S P Y L I L
46 55

N I Y E G L P L S
75

FIGURA 19: Sequência de aminoácidos da porção N-terminal dos fragmentos 36 e 46.

Em (A) tem-se a sequência completa de aminoácidos da porção N-terminal do fragmento 36 e em (B) do fragmento 46. Os aminoácidos destacados em amarelo tiveram sua sequência confirmada por sequenciamento automático de aminoácidos pelo método de degradação de Edman.

5.8 Purificação do fragmento 36 de CeEI expresso em leveduras

O meio de cultura, contendo as leveduras onde foi expresso o fragmento 36 do CeEI, foi centrifugado e o sobrenadante foi submetido aos processos de purificação.

Inicialmente, o sobrenadante teve suas proteínas precipitadas por acetona. Os precipitados resultantes do fracionamento por acetona foram dissolvidos e testados com EN. Somente a fração precipitada com 40% de acetona apresentou atividade inibitória sobre EN e, por isso, foi usada na etapa seguinte.

O material precipitado com 40% de acetona foi dissolvido em tampão e submetido a uma filtração em gel em coluna Superdex G-75 no cromatógrafo Äkta. O perfil de eluição está mostrado na **FIGURA 20-A**. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente nas frações de 55 a 62.

O *pool* das frações da filtração em gel, com maior atividade inibitória sobre EN, foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF no cromatógrafo Äkta. O perfil de eluição está na **FIGURA 20-B**. A atividade inibitória sobre EN foi encontrada principalmente nas frações de 22 a 37.

O material eluído da cromatografia de troca iônica foi submetido a uma cromatografia de fase reversa, mesmo já não apresentando mais atividade inibitória. O fragmento apresentou dois picos proteicos principais, com tempos de retenção semelhantes, conforme **FIGURA 20-C**.

5.9 Caracterização dos fragmentos 36 e 46 de CeEI purificados

5.9.1 Determinação da atividade inibitória sobre EN

Os fragmentos 36 e 46 de CeEI foram capazes de inibir EN; porém, essa atividade era perdida com o tempo e durante as etapas de purificação.

O fragmento 55 não apresentou atividade inibitória. Para o fragmento 36, calcularam-se as concentrações, tanto para o material expresso em bactérias (**FIGURA 21-A**), como em leveduras (**FIGURA 21-B**). Nas etapas seguintes de purificação o material só foi testado quanto à sua atividade inibitória sobre EN e não titulado. O fragmento 46 apresentou atividade inibitória sobre EN, sendo que, logo após a expressão, a quantidade de inibidor foi calculada, como visto na **FIGURA 21-C**.

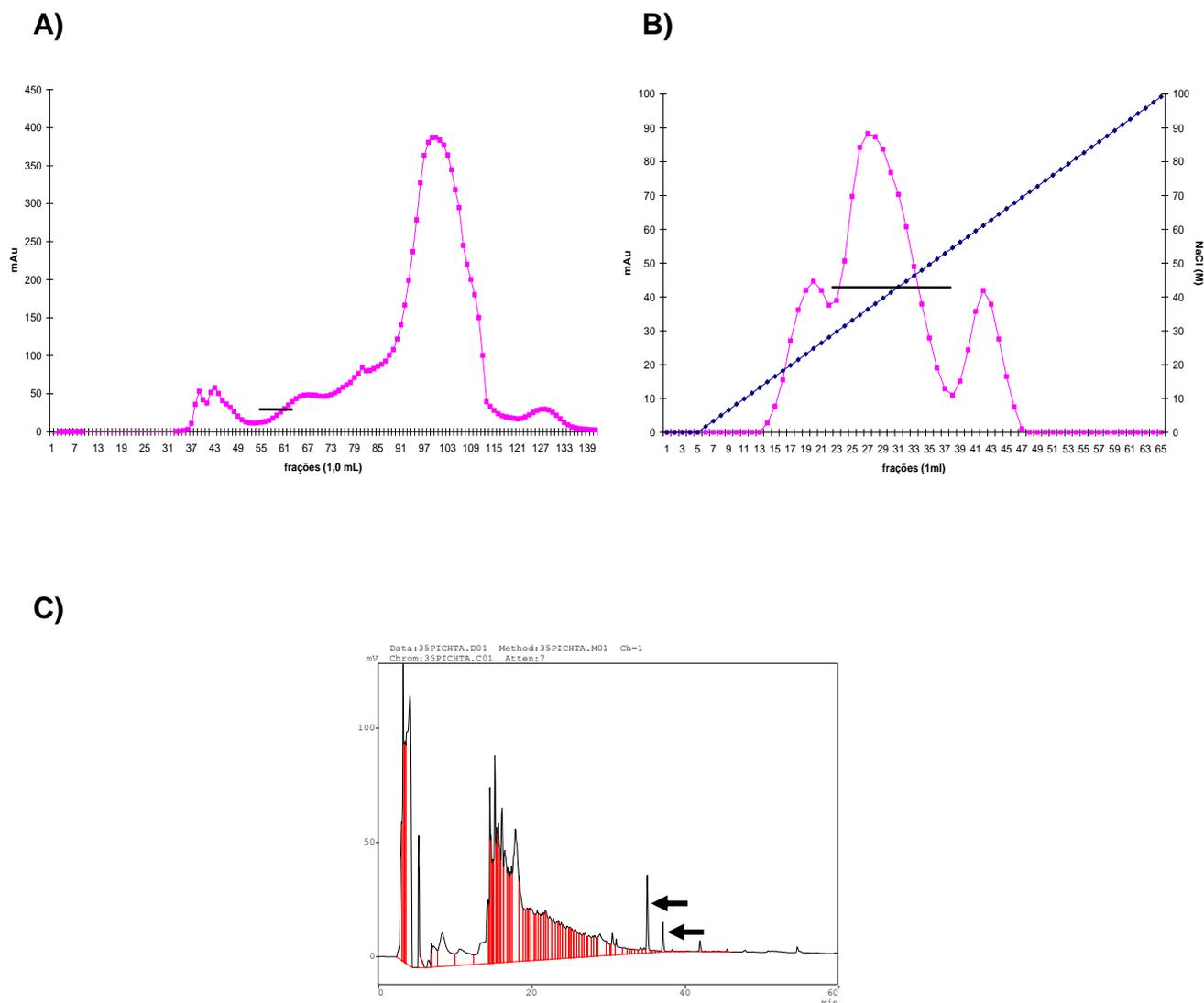


FIGURA 20: Purificação do fragmento 36 de CeEI expresso em leveduras.

A) após o fracionamento das proteínas contidas no meio de cultura de *P. pastoris*, o precipitado foi dissolvido, filtrado e submetido a uma filtração em gel em coluna Superdex G-75.

B) o *pool* das frações que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN da etapa anterior foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q-FF.

C) o *pool* das frações que apresentaram maior atividade inibitória sobre EN da etapa anterior foi submetido a uma cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈.

As maiores atividades inibitórias sobre EN foram encontradas nas frações destacadas com uma barra/seta.

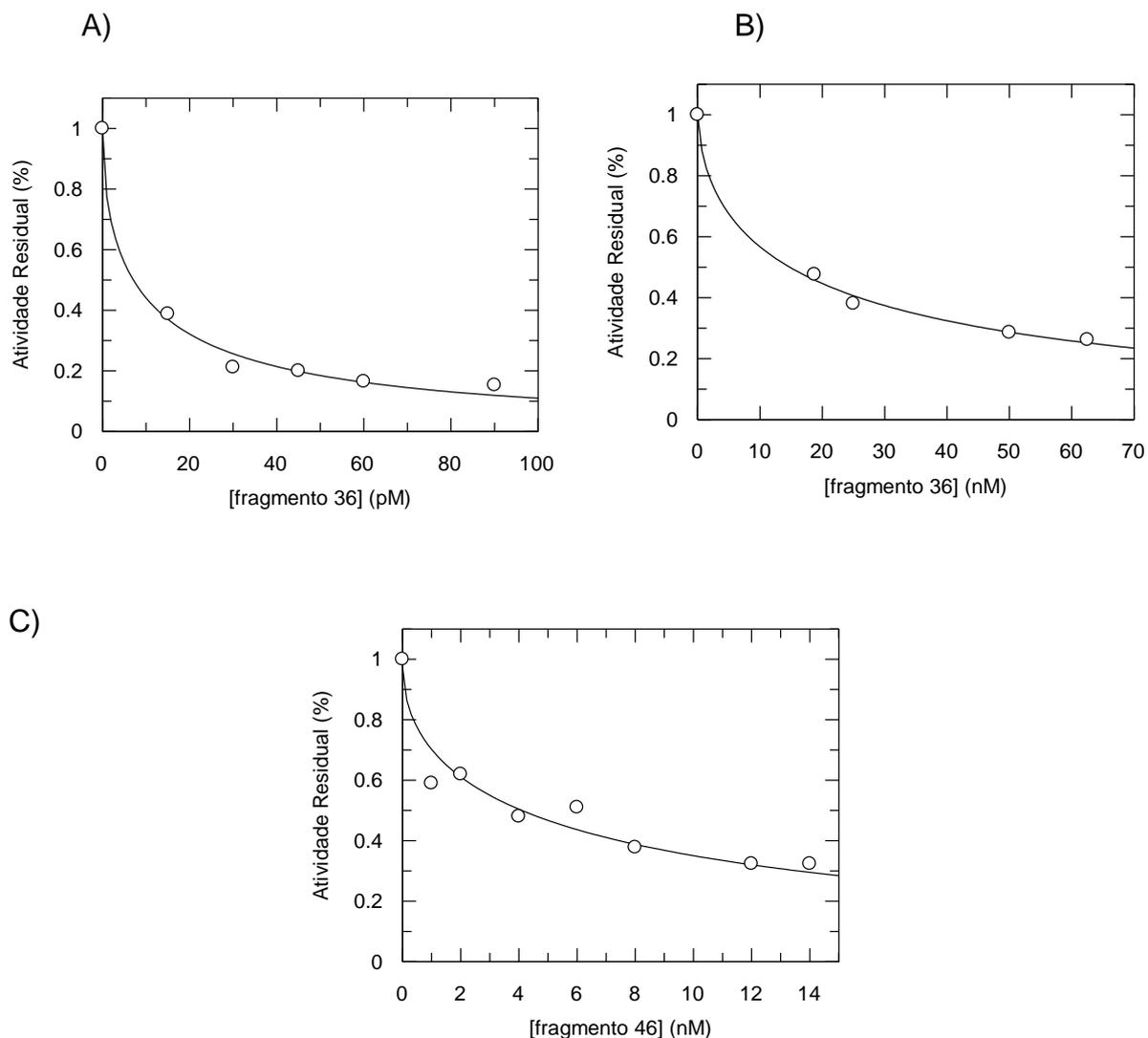


FIGURA 21: Curva de inibição de elastase de neutrófilo pelos fragmentos de CeEI.

EN titulada (1,00 nM) foi incubada com diferentes volumes da solução contendo, A) o fragmento 36 após expressão em bactérias, B) fragmento 36 após expressão em leveduras e C) fragmento 46 após expressão em bactérias, em tampão Tris 50 mM pH 8,0, por 10 min a 37°C; logo após, o substrato MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan (0,2 mM) foi adicionado e sua hidrólise foi acompanhada pela leitura da absorbância em 405 nm.

A) A concentração do fragmento 36 expresso em bactérias calculada foi de 0,3 nM.

B) A concentração do fragmento 36 expresso em leveduras calculada foi de 125 nM.

C) A concentração do fragmento 46 expresso em bactérias calculada foi de 20 nM.

5.10 Modelo de edema pulmonar *in vivo*

Nesse modelo, o edema pulmonar foi induzido por lipopolissacarídeo. Foram analisados o lavado bronqueoalveolar (BAL), pulmão, sangue e soro dos animais.

5.10.1 Dosagem de proteínas

Foi feita a determinação da quantidade de proteínas no BAL em todos os grupos, ou seja, no grupo controle positivo, controle negativo, tratado com inibidor de Cat G (CeKI) e com inibidor tanto de EN quanto de Cat G (rCeEI). A dosagem foi feita pelo método de Bradford e não houve diferença estatisticamente significativa entre os diversos grupos.

5.10.2 Eletroforese das amostras de BAL

A análise do gel de poliacrilamida, após eletroforese, não revelou diferenças qualitativas entre os BAL dos animais tratados e controles.

5.10.3 Quantificação de PMN no BAL

Os resultados da quantificação de PMN mostraram que houve diferença estatisticamente significativa no número de células presentes nos BAL dos diferentes grupos (**FIGURA 22**). O grupo controle positivo teve um maior número de PMN que foi diminuído nos animais tratados com CeKI e rCeEI.

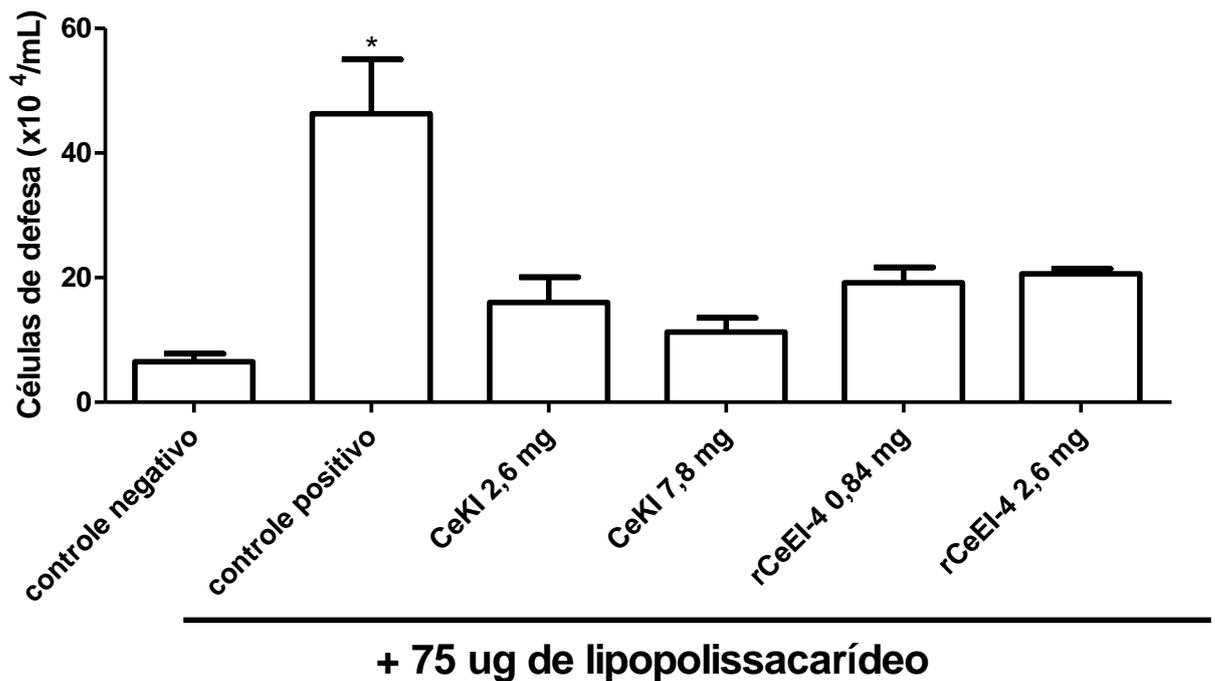


FIGURA 22: Quantidade de células de defesa no BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento descrito em MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e foi feita a lavagem bronqueoalveolar com tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Alíquotas de 20 µl do BAL foram misturadas com 20 µl de azul de Trypan para a quantificação e avaliação da viabilidade de PMN. A contagem foi feita em Câmara de Neubauer em, pelo menos, quatro campos usando-se um microscópio óptico. O total de células vivas foi calculado em relação ao total de células encontrado e expresso em porcentagem.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

*** Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo.**

5.10.4 Análise do BAL

Todas as enzimas estudadas foram dosadas nos BAL dos pulmões; entretanto, não foram observadas atividades de Cat G ou de EN. Foi detectada uma baixa atividade de HuPK, mas não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Na dosagem de MPO, somente os grupos tratados com rCeEI-4 apresentaram atividade menor em relação ao grupo positivo (**FIGURA 23**), sendo que essa atividade foi menor mesmo quando comparada ao controle negativo. Nos dois grupos tratados com inibidores, a dosagem da atividade de ECA foi estatisticamente menor quando comparado ao grupo controle positivo (**FIGURA 24**). Para as cininas, houve diferenças significativas entre os grupos tratados com inibidores quando comparados ao grupo controle positivo (**FIGURA 25**). Quanto à atividade inibitória do BAL, verificou-se a possível presença de inibidores endógenos de EN que aumentaram com o aumento da quantidade utilizada de material (**FIGURA 26**), mas quando foi testada a atividade inibitória sobre Cat G, não foi observado o aumento da inibição sobre essa enzima com o aumento de volume do BAL.

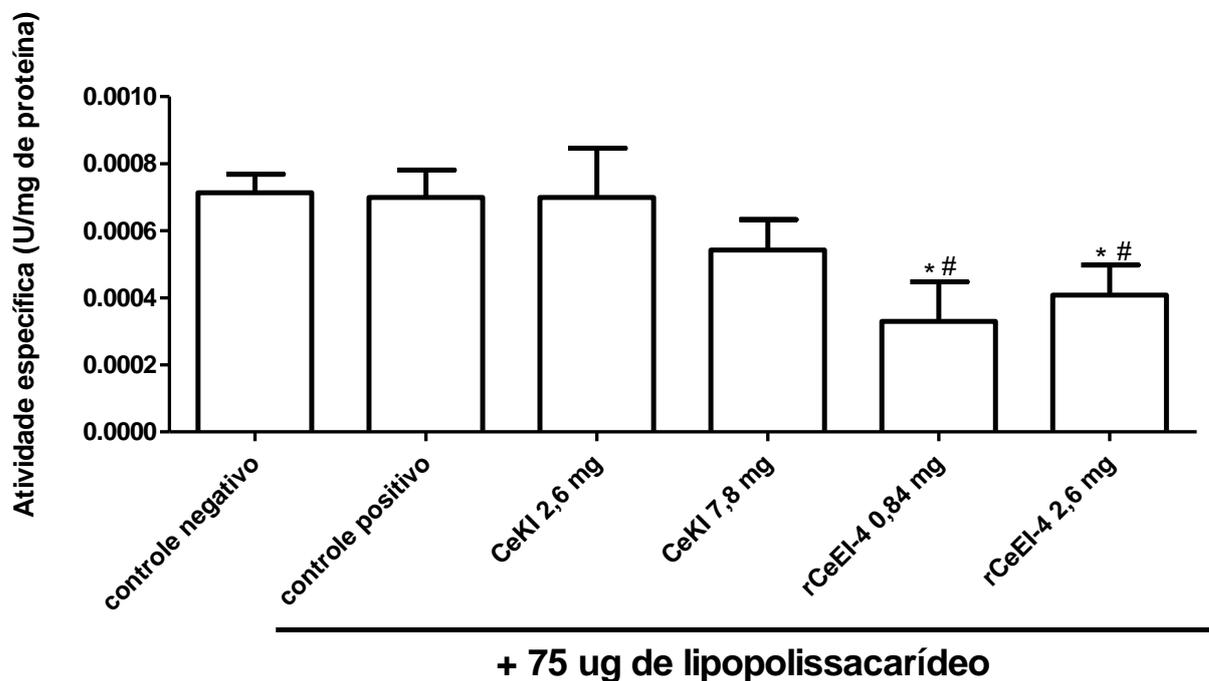


FIGURA 23: Atividade do tipo MPO nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento descrito em MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e o plasma foi separado após centrifugação por 10 min a 3400xg a 4°C. Reagiram-se 5 µl do sobrenadante com *o*-dianisidina (1,5 mM) e H₂O₂ (22 mM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada por absorvância em 450 nm, durante 5 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

*** Houve diferença significativa em relação ao grupo controle negativo e # controle positivo ($p < 0,05$).**

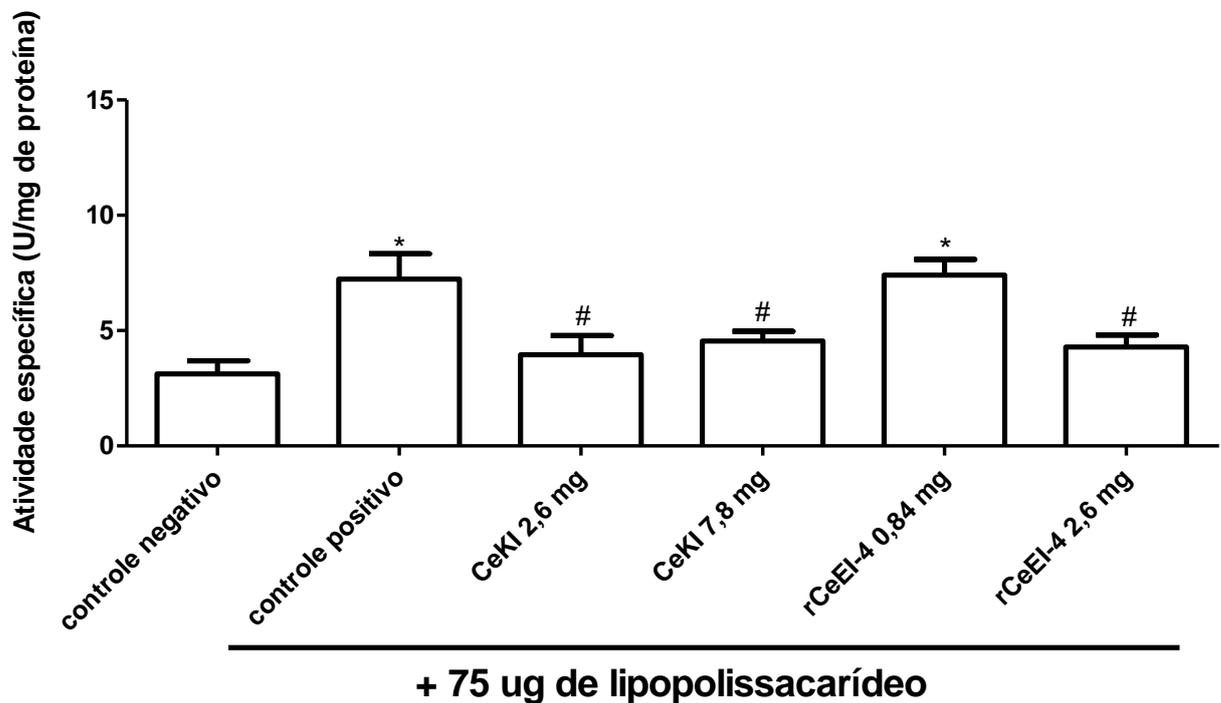


FIGURA 24: Atividade do tipo ECA nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento descrito em MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e foi feita a lavagem bronqueoalveolar com tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Após centrifugação por 10 min a 3400xg a 4°C, reagiram-se 5 µl desse sobrenadante com o substrato fluorogênico Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH (10 µM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada em λ_{exc} 320 nm e λ_{em} 420 nm, durante 30 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

* Houve diferença significativa em relação ao grupo controle negativo e # controle positivo ($p < 0,05$).

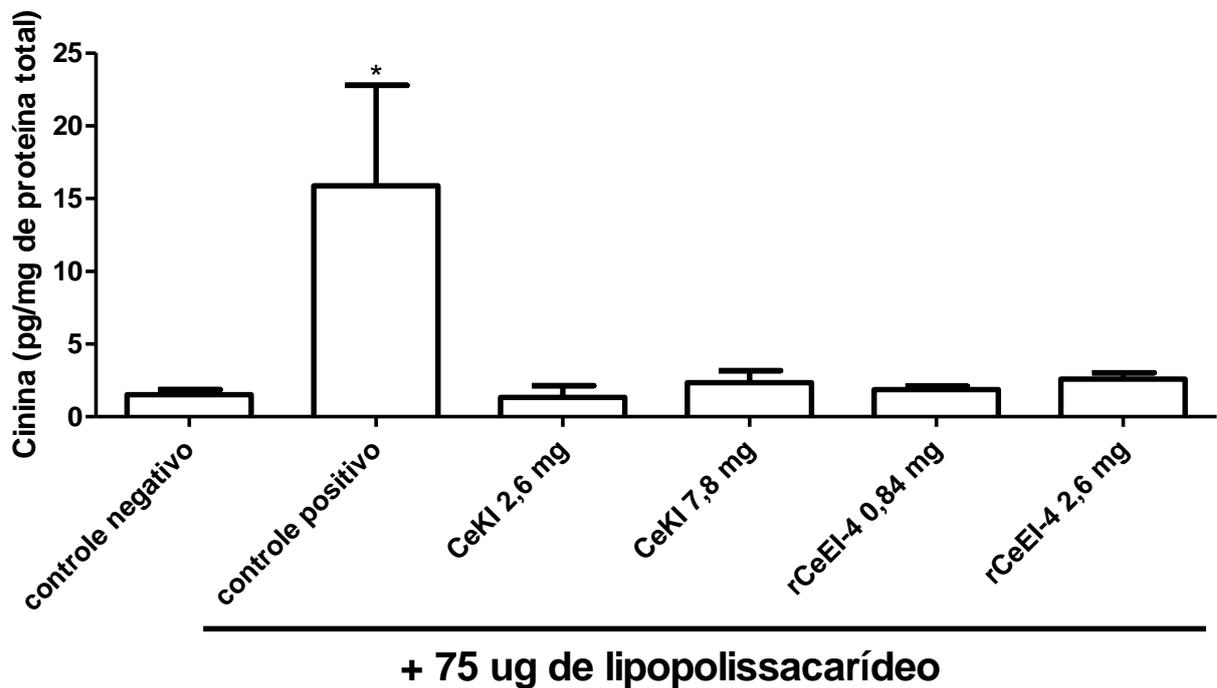


FIGURA 25: Quantificação de cinina nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento descrito em MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e foi feita a lavagem bronqueoalveolar com tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Após centrifugação por 10 min a 3400xg a 4°C, adicionou-se um coquetel de inibidores a 500 µl do sobrenadante e as cininas foram extraídas. A quantificação de BK foi feita com a utilização de anticorpo anti-BK e tirosil-BK marcada com ¹²⁵Iodo. As reações foram feitas em duplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

*** Houve diferença significativa em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).**

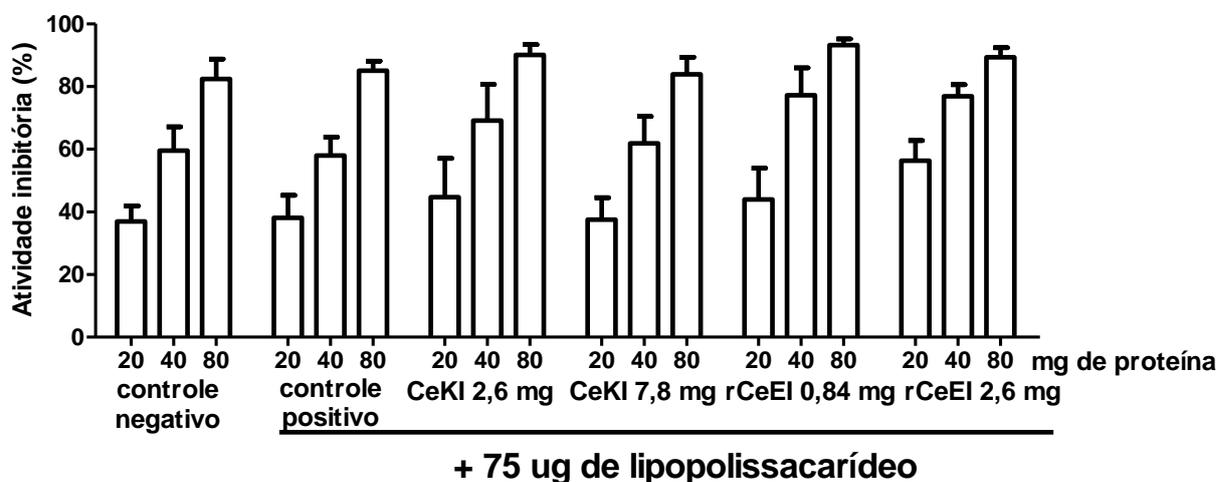


FIGURA 26: Atividade inibitória sobre EN nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento descrito em MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e foi feita a lavagem bronqueoalveolar com tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Após centrifugação por 10 min a 3400xg a 4°C, volumes crescentes de BAL (20-80 µl) foram incubados com EN (0,5 nM); após 5 min, adicionou-se o substrato MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (20 µM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada por fluorescência em λ_{exc} 360 nm λ_{em} 460 nm, durante 30 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

Não houve diferença significativa entre os grupos, mas há diminuição de atividade de EN com o aumento do volume de material.

5.10.5 Análise das atividades enzimáticas presentes no plasma ou no soro

No plasma, não foi detectada atividade de EN. Foi observada atividade de HuPK; porém, não se observaram diferenças entre os grupos. No plasma, a atividade de MPO não foi alterada nos grupos tratados com inibidor de Cat G, entretanto foi significativamente menor nos grupos tratados com inibidor de EN e Cat G e tal redução varia com a dose; além disso, os grupos tratados com rCeEI apresentaram valores menores do que o controle negativo (**FIGURA 27**). Avaliando-se o soro dos animais, verificou-se que a de ECA não apresentou diferenças entre os grupos (**FIGURA 28**). Em relação à presença de cininas, houve uma redução significativa na quantidade de cinina nos grupos que receberam tratamento e também, os animais tratados com rCeEI apresentaram quantidades de cininas inferiores aos dos animais tratados com CeKI (**FIGURA 29**).

5.10.6 Análise das atividades enzimáticas presentes no pulmão

No pulmão, a atividade de MPO (**FIGURA 30**) e de EN (**FIGURA 31**) foram estatisticamente diferentes somente quando analisados os animais tratados com inibidor de Cat G e EN (rCeEI-4), além disso, essa atividade é estatisticamente menor quando comparada ao controle negativo, sem a indução da doença. Isso não foi visto nos animais tratados somente com inibidor de Cat G. Quanto à atividade de Cat G, não houve diferença entre os grupos (**FIGURA 32**). Novamente a atividade de ECA foi reduzida nos grupos tratados com rCeEI (**FIGURA 33**) bem como a presença de cininas (**FIGURA 35**) que foi reduzida nos animais tratados com rCeEI. A atividade de HuPK (**FIGURA 34**) não apresentou diferenças estatísticas.

Também foi medida a atividade inibitória sobre EN no pulmão; quando se utilizam 40 e 80 µl do material, o grupo controle negativo e os grupos que receberam o inibidor de EN apresentaram atividade inibitória menor e diferente do grupo controle positivo (**FIGURA 36**). Não houve um comportamento dependente do volume quando a atividade inibitória de Cat G foi analisada.

A **TABELA III** é uma representação das atividades encontradas em cada material biológico, mesmo que o gráfico não tenha sido apresentado, pela atividade ser baixa e/ou sem diferença estatística. Na **TABELA IV** há um resumo das atividades que foram estatisticamente diferentes na comparação entre os grupos.

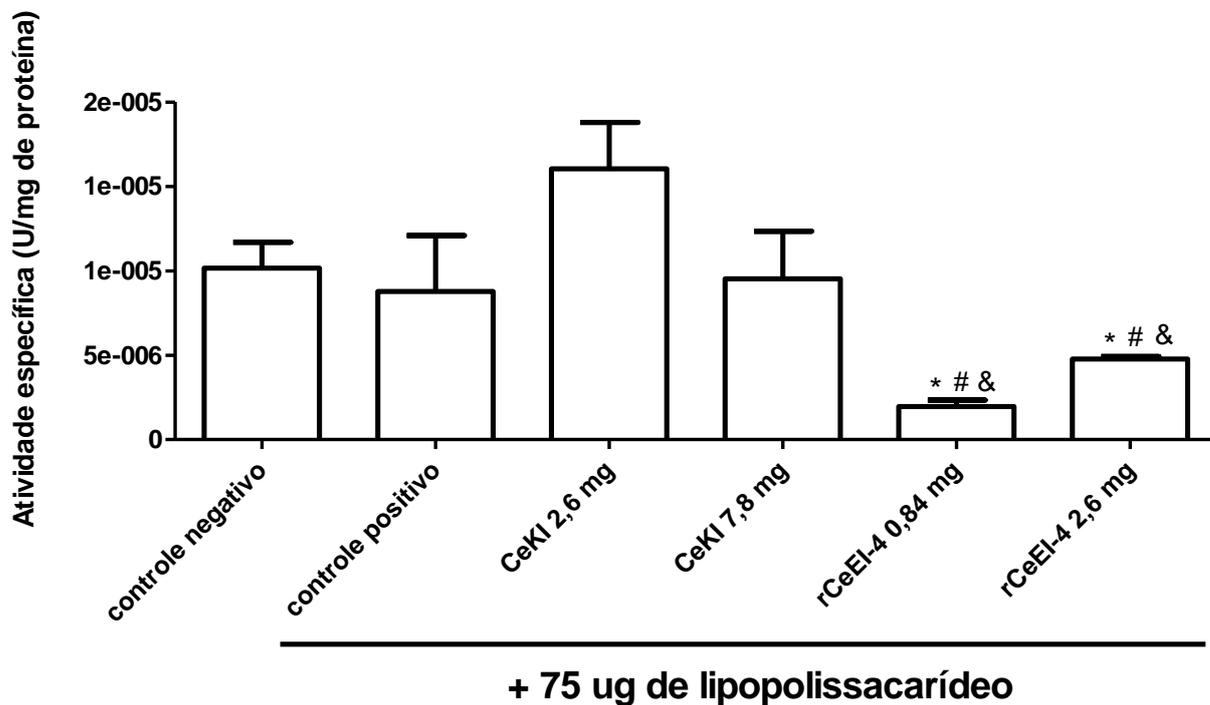


FIGURA 27: Atividade do tipo MPO nos plasmas dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento descrito em MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e o plasma foi separado após centrifugação por 15 min a 270xg a 4°C. Reagiram-se 5 µl da amostra com *o*-dianisidina (1,5 mM) e H₂O₂ (22 mM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada por absorvância em 450 nm, durante 5 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

Houve diferença significativa entre os grupos e o * grupo controle negativo, # o grupo controle positivo e & grupos tratados com CeKI ($p < 0,05$).

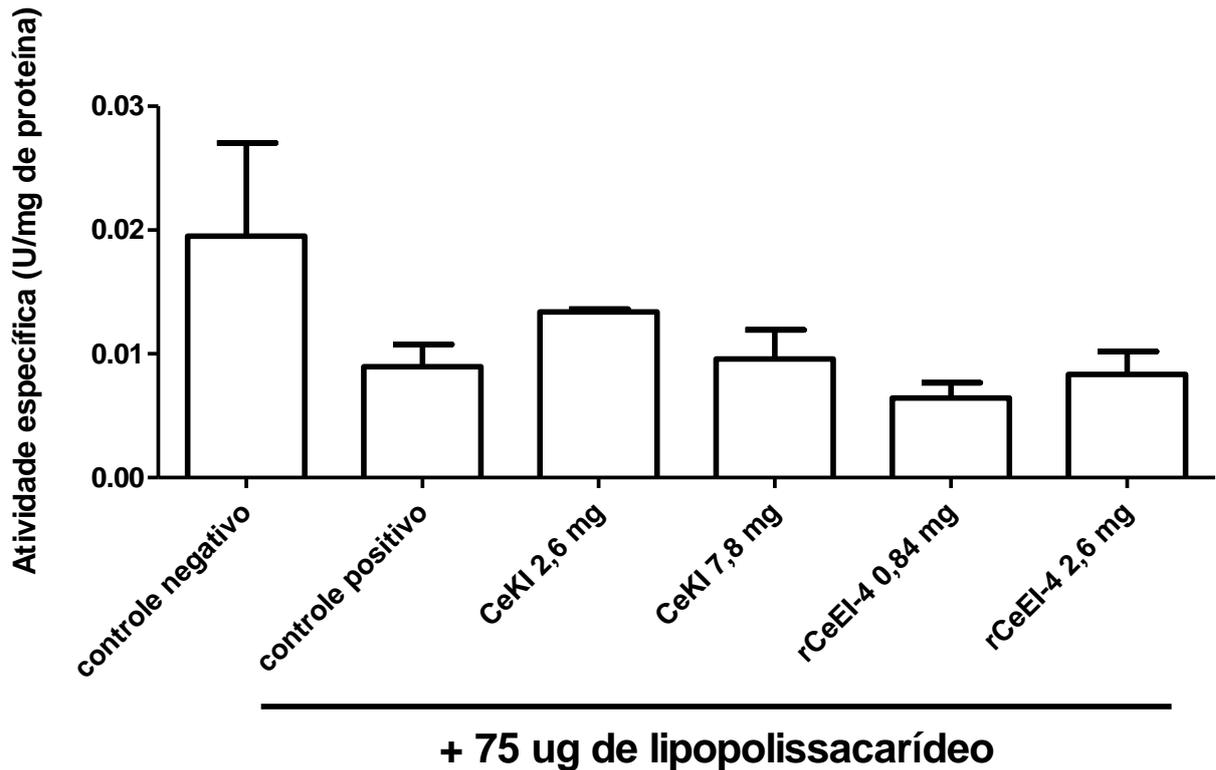


FIGURA 28: Atividade do tipo ECA nos soros dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e o soro foi separado após centrifugação por 15 min a 270xg a 4°C. Reagiram-se 5 µl da amostra com o substrato fluorogênico Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH (10 µM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada em λ_{exc} 320 nm e λ_{em} 420 nm, durante 30 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle positivo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle negativo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

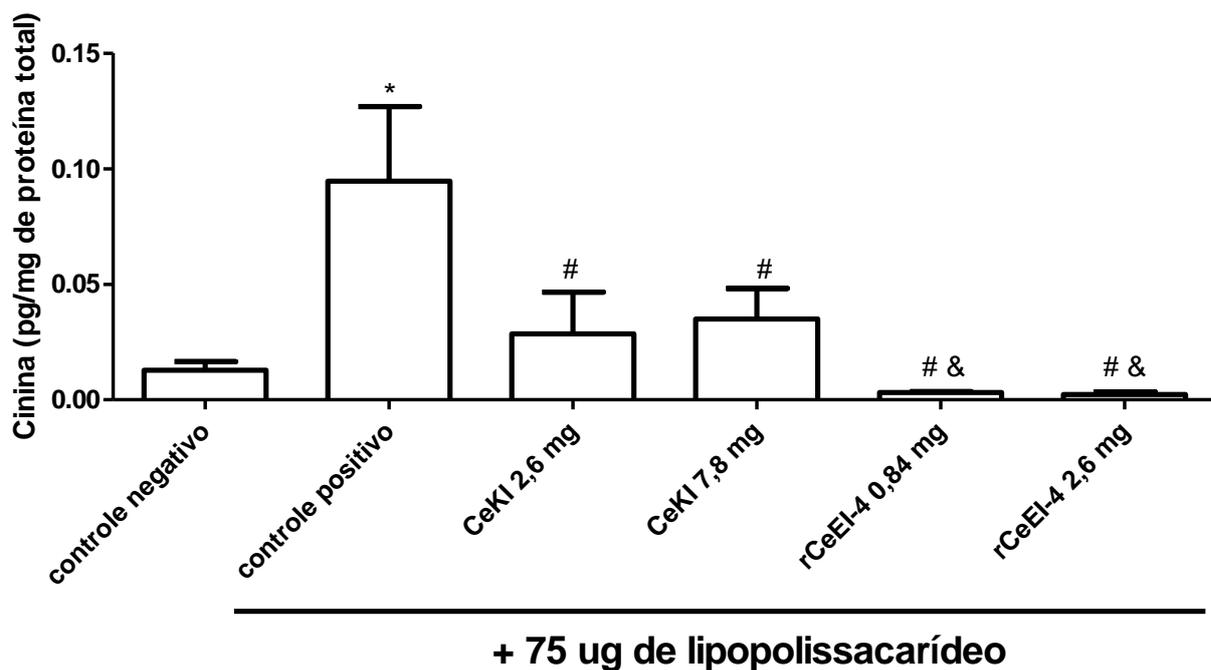


FIGURA 29: Quantificação de cinina nos plasmas dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e o sangue foi retirado. O plasma foi separado após centrifugação por 15 min a 270xg a 4°C. Adicionou-se um coquetel de inibidores a 150 µl do plasma e as cininas foram extraídas. A quantificação de BK foi feita com a utilização de anticorpo anti-BK e tirosil-BK marcada com ¹²⁵Iodo. As reações foram feitas em duplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

Houve diferença significativa entre os grupos e o * grupo controle negativo, # o grupo controle positivo e & grupos tratados com CeKI (p<0,05).

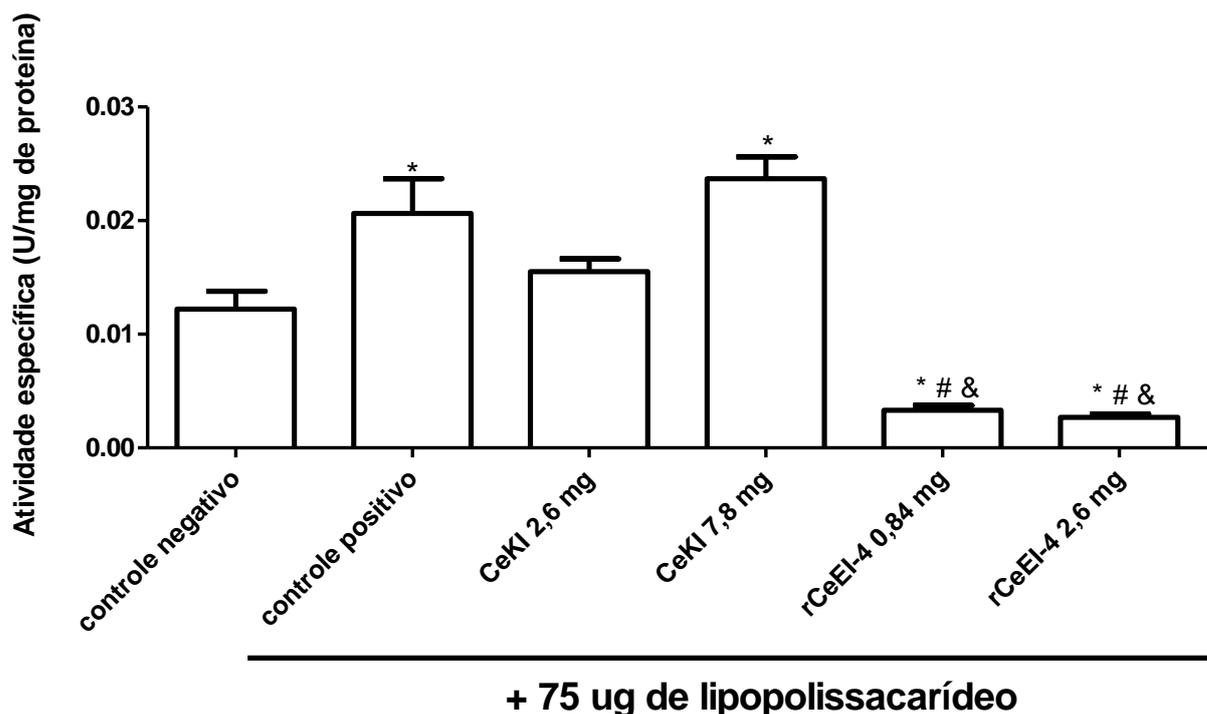


FIGURA 30: Atividade do tipo MPO nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Reagiram-se 10 µl do sobrenadante do pulmão com *o*-dianisidina (1,5 mM) e H₂O₂ (22 mM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada por absorbância em 450 nm, durante 5 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

Houve diferença significativa entre os grupos e o * grupo controle negativo, # o grupo controle positivo e & grupos tratados com CeKI ($p < 0,05$).

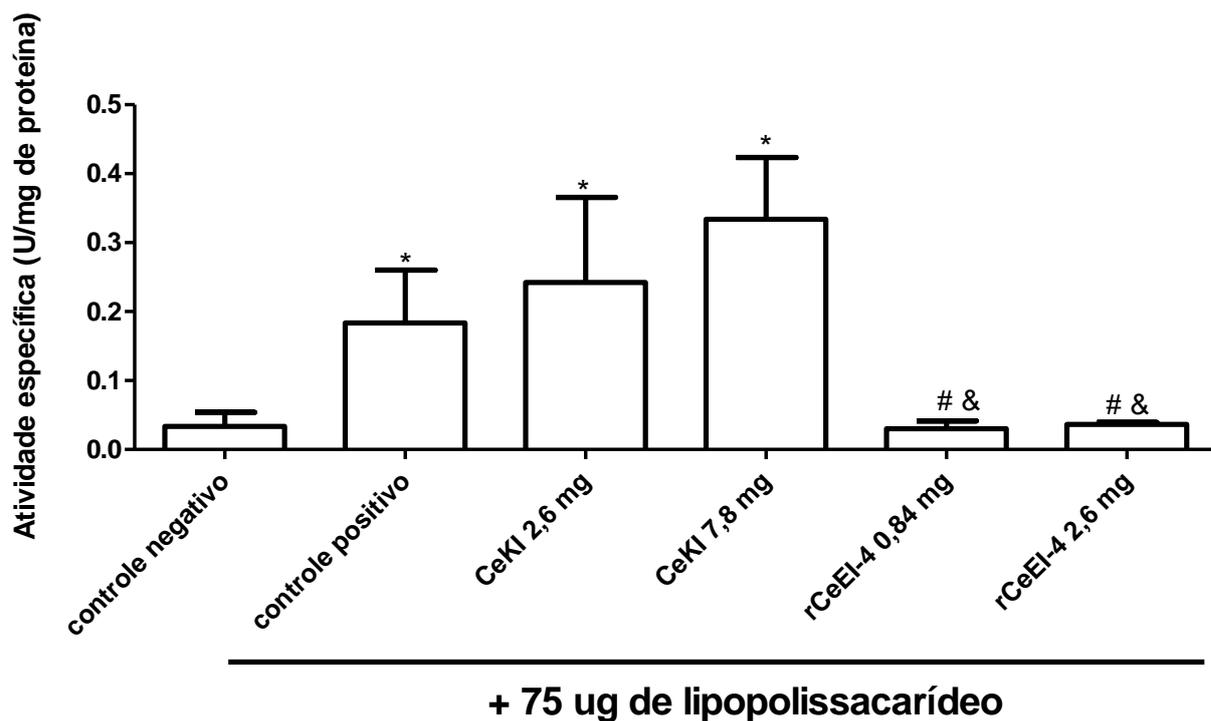


FIGURA 31: Atividade do tipo EN nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Reagiram-se 10 µl do sobrenadante do pulmão com MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (10 µM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada por fluorescência em λ_{exc} 360 nm λ_{em} 460 nm, durante 30 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

Houve diferença significativa entre os grupos e o * grupo controle negativo, # o grupo controle positivo e & grupos tratados com CeKI ($p < 0,05$).

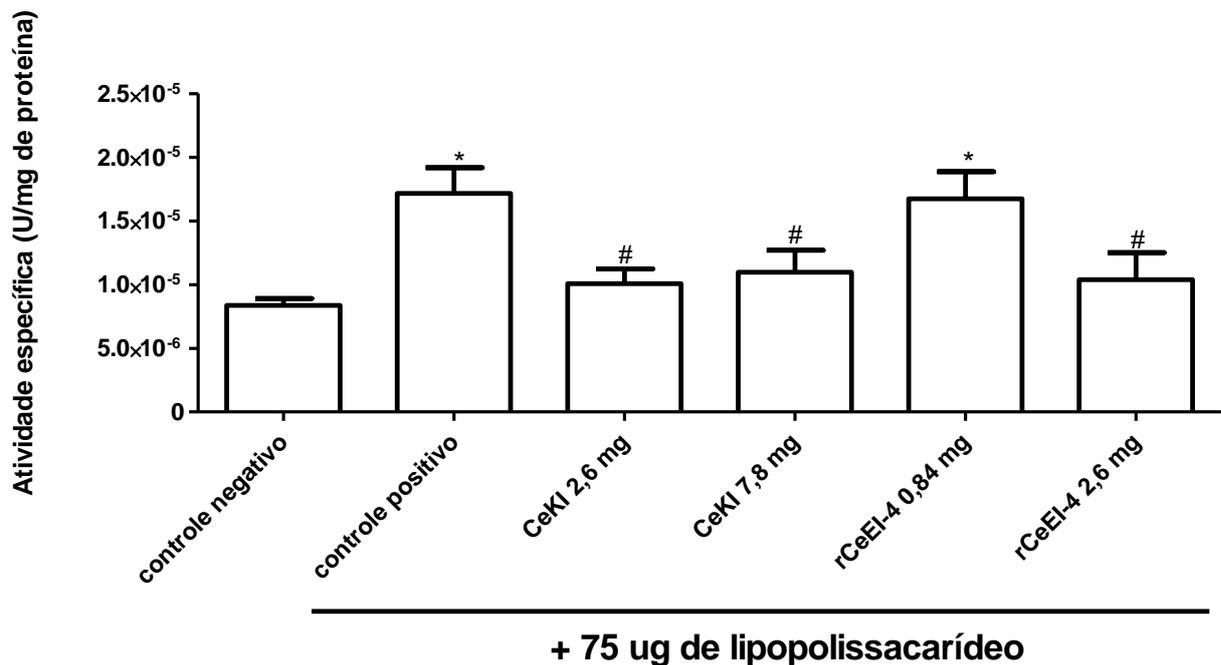


FIGURA 32: Atividade do tipo Cat G nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Reagiram-se 10 µl do sobrenadante do pulmão com Abz-Thr-Pro-Phe-Ser-Gly-Gln-EDDnp (20 µM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada por fluorescência em λ_{exc} 320 nm λ_{em} 420 nm, durante 30 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

*** Houve diferença significativa entre os grupos e o grupo controle negativo e # houve diferença estatística entre o grupo controle positivo ($p < 0,05$).**

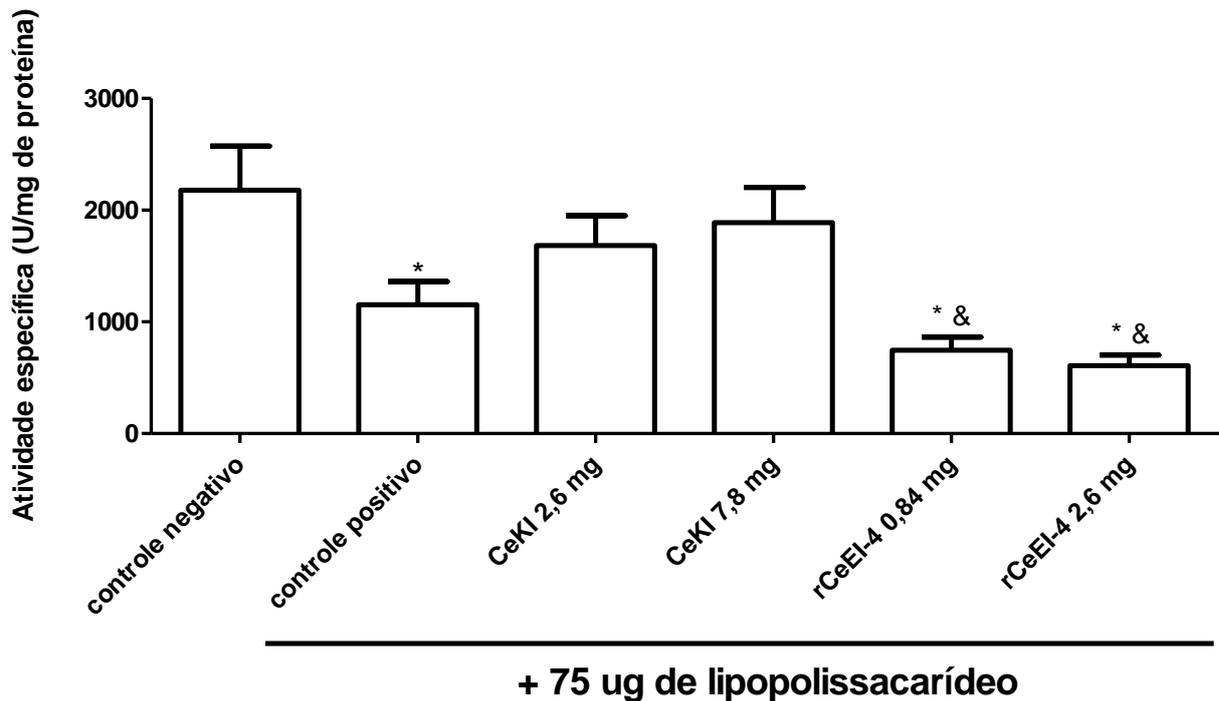


FIGURA 33: Atividade do tipo ECA nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Reagiram-se 5 µl do sobrenadante do pulmão com o substrato fluorogênico Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH (10 µM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada em λ_{exc} 320 nm e λ_{em} 420 nm, durante 30 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

*** Houve diferença significativa entre os grupos e o grupo controle negativo e & entre os grupos tratados com CeKI ($p < 0,05$).**

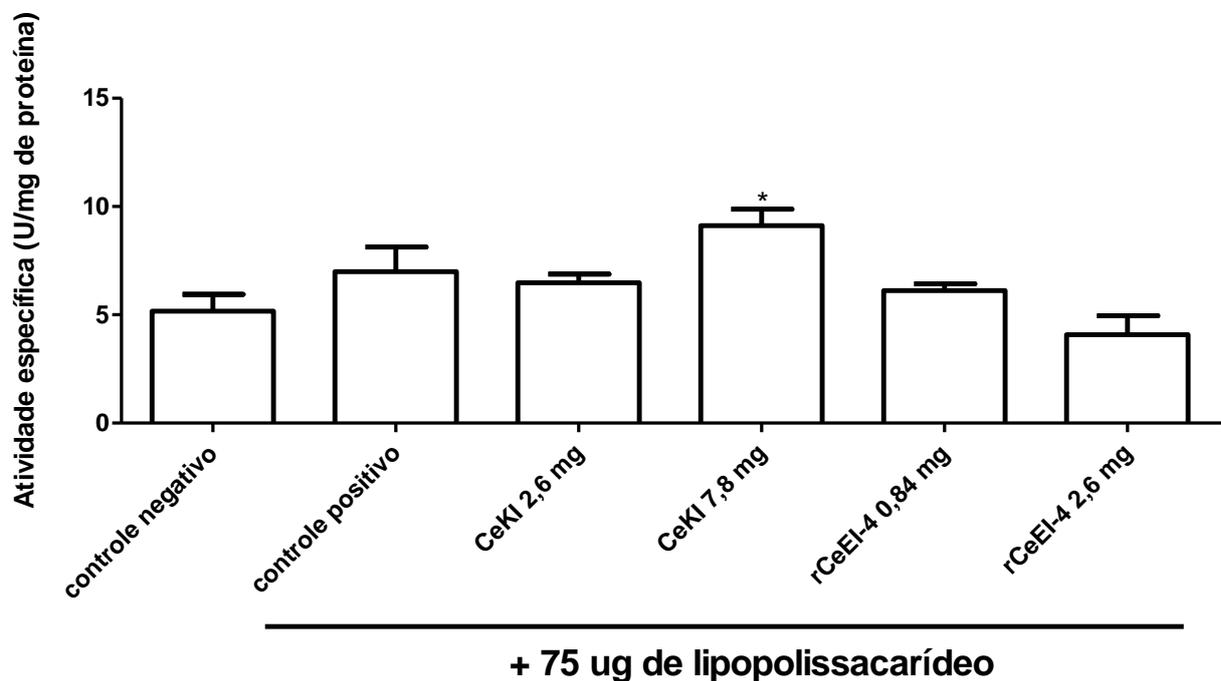


FIGURA 34: Atividade do tipo HuPK nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Reagiram-se 10 µl do sobrenadante do pulmão com H-D-Pro-Phe-Arg-AMC (10 µM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada por fluorescência em λ_{exc} 360 nm λ_{em} 460 nm, durante 30 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

* Houve diferença significativa entre o grupo tratado com a maior concentração do inibidor de Cat G e o grupo controle negativo ($p < 0,05$).

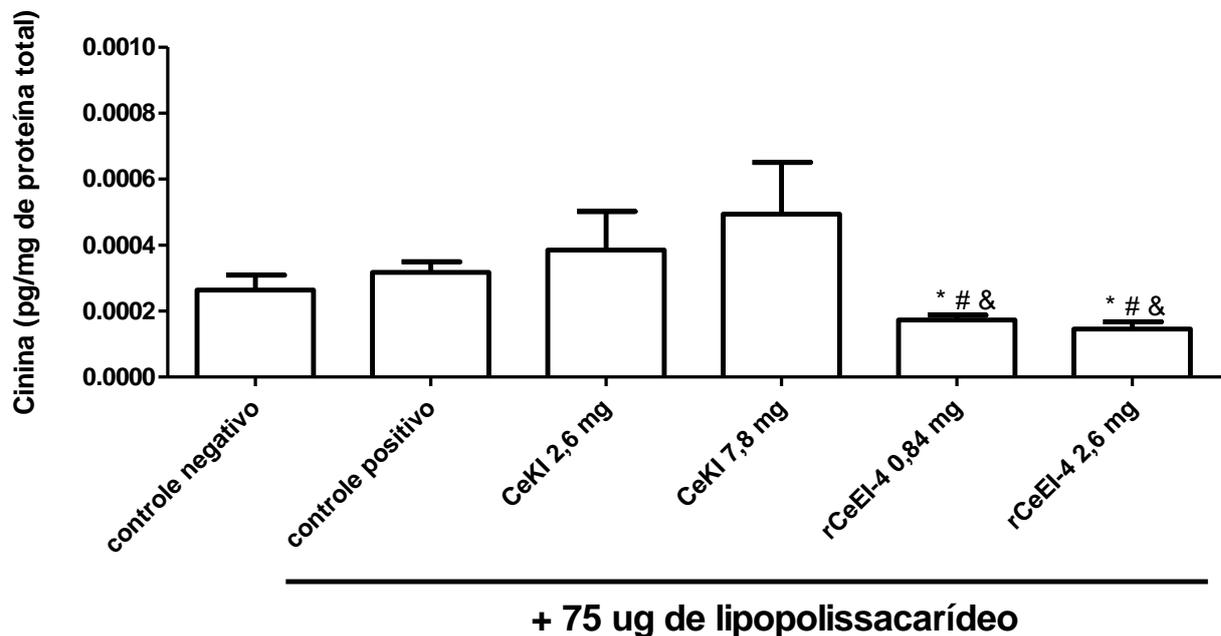


FIGURA 35: Quantificação de cinina nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Adicionou-se um coquetel de inibidores a 200 µl do plasma e as cininas foram extraídas. A quantificação de BK foi feita com a utilização de anticorpo anti-BK e tirosil-BK marcada com ¹²⁵Iodo. As reações foram feitas em duplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

Houve diferença significativa entre os grupos e o * grupo controle negativo, # o grupo controle positivo e & grupos tratados com CeKI ($p < 0,05$).

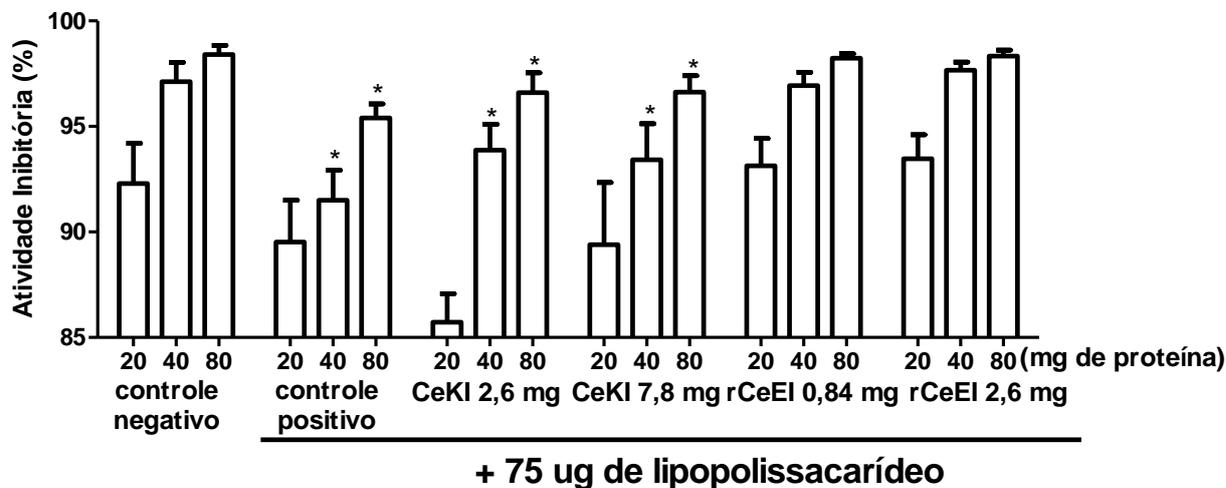


FIGURA 36: Atividade inibitória sobre EN nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Volumes crescentes de pulmão (20-80 µl) foram incubados com EN (0,5 nM), após 5 min, adicionou-se o substrato MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (20 µM), num volume final de 200 µl. A reação foi acompanhada por fluorescência em λ_{exc} 360 nm λ_{em} 460 nm, durante 30 min a 37°C. As reações foram feitas em triplicatas.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

***Houve diferença significativa entre os grupos controle positivo e tratados com inibidor de Cat G em relação ao grupo controle negativo nos volumes de 40 e 80 µl ($p < 0,05$).**

TABELA III: Atividades das diferentes peptidases encontradas nos materiais biológicos.

material/atividade	EN	HuPK	MPO	ECA	cinina	Cat G
Plasma	Não	Sim	Sim	----	Sim*	----
Soro	----	----	----	Sim	----	----
BAL	Não	Sim	Sim	Sim*	Sim*	Não
Pulmão	Sim*	Sim	Sim*	Sim	Não	Sim*

EN - Elastase de neutrófilo; HuPK - calicreína plasmática; MPO - mieloperoxidase, ECA - enzima conversora de angiotensina, Cat G – catepsina G, BAL - lavado bronqueoalveolar, **Sim** - atividade presente; **Sim*** - atividade estatisticamente diferente quando comparadas ao grupo controle positivo; **Não** - atividade ausente; ---- atividade não foi testada.

As atividades proteolíticas foram testadas em todos os materiais biológicos coletados de todos os animais dos seis grupos estudados; o pulmão apresentou atividade de todas as enzimas.

TABELA IV: Resumo das atividades encontradas em comparação entre os grupos.

Material	atividade	Tratado com CeKI		Tratado com rCeEI		CeKI
		controle negativo	controle positivo	controle negativo	controle positivo	
BAL	MPO	=	=	↓	↓	=
	ECA	=	↓	=	↓	=
	cinina	=	↓	=	↓	=
Sangue	MPO	=	=	↓	↓	↓
	cinina	=	↓	=	↓	↓
Pulmão	EN	↑	=	=	↓	↓
	MPO	↑	=	↓	↓	↓
	ECA	=	=	↓	=	↓
	cinina	=	=	↓	↓	=
	Cat G	=	↓	=	↓	=

EN - Elastase de neutrófilo; MPO - mieloperoxidase, ECA - enzima conversora de angiotensina, Cat G – catepsina G, BAL - lavado bronqueoalveolar, = - atividade é estatisticamente igual à atividade do grupo comparado; ↓ - a atividade é estatisticamente menor do que a do grupo comparado e ↑ - a atividade é estatisticamente maior do que a do grupo comparado.

As atividades proteolíticas foram testadas em todos os materiais biológicos coletados de todos os animais dos seis grupos estudados; o pulmão apresentou atividade de todas as enzimas. Somente as atividades que apresentaram diferenças estatísticas foram comparadas entre os grupos.

5.10.7 Análise de marcadores inflamatórios

Citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e antiinflamatórias (IL-10), clássicas nesse modelo, foram quantificadas por ELISA.

No BAL, a concentração de IL-6 foi elevada em todos os grupos (**FIGURA 37**). A concentração de TNF- α isolada não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos (**FIGURA 38**). Analisando-se a razão TNF- α /IL-10, há um aumento estatístico somente nos grupos tratados com rCeEI (**TABELA V**).

No pulmão, houve um aumento na concentração de IL-6 nos grupos tratados com rCeEI (**FIGURA 39**) e esse aumento é dependente da dose, como visto no aumento entre os grupos tratados com 0,84 mg e 2,6 mg de rCeEI. Houve um aumento na concentração de TNF- α em todos os grupos (**FIGURA 40**) e a razão TNF- α /IL-10 foi diminuída somente quando os animais foram submetidos ao tratamento com rCeEI (**TABELA V**).

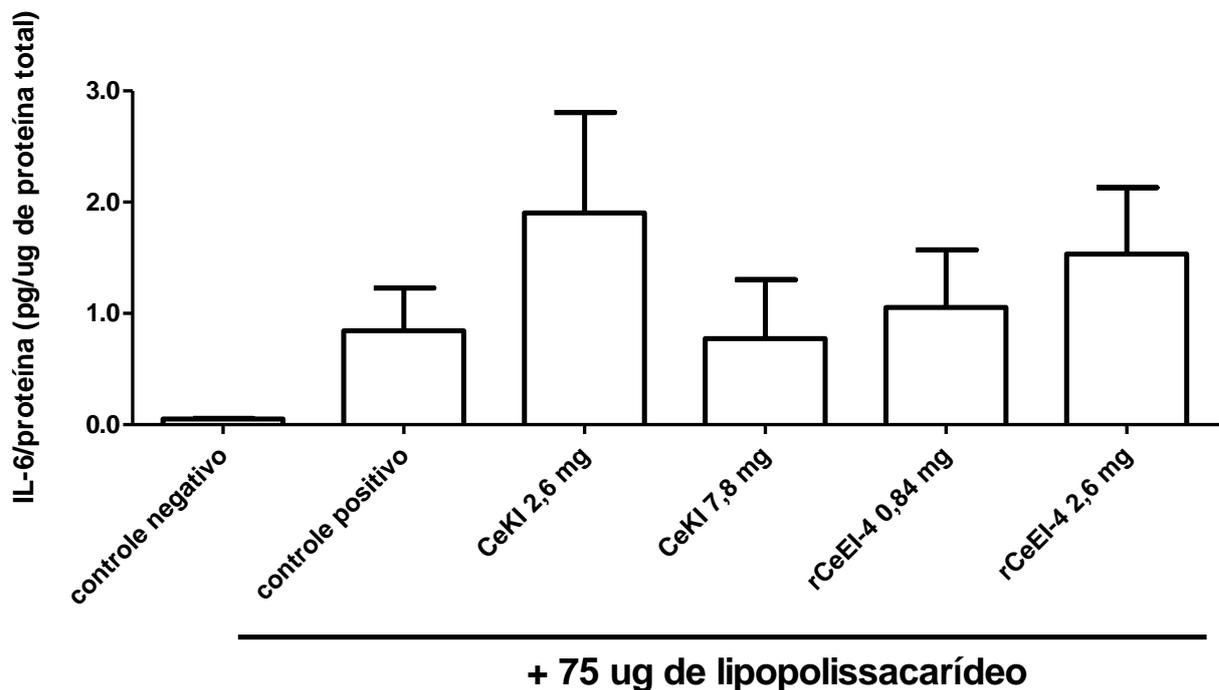


FIGURA 37: Determinação da quantidade de IL-6 nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e foi feita a lavagem bronqueoalveolar com tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Em 50 μ l da amostra, foi dosada a quantidade de IL-6 utilizando-se o kit *Quantikine immunoassay* de IL-6, corrigidas pela concentração de proteína nas amostras e comparadas à curva padrão.

Controle negativo \Leftrightarrow tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo \Leftrightarrow 75 μ g de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg \Leftrightarrow 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg \Leftrightarrow 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg \Leftrightarrow 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg \Leftrightarrow 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão.

Não houve diferença significativa entre controle negativo em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).

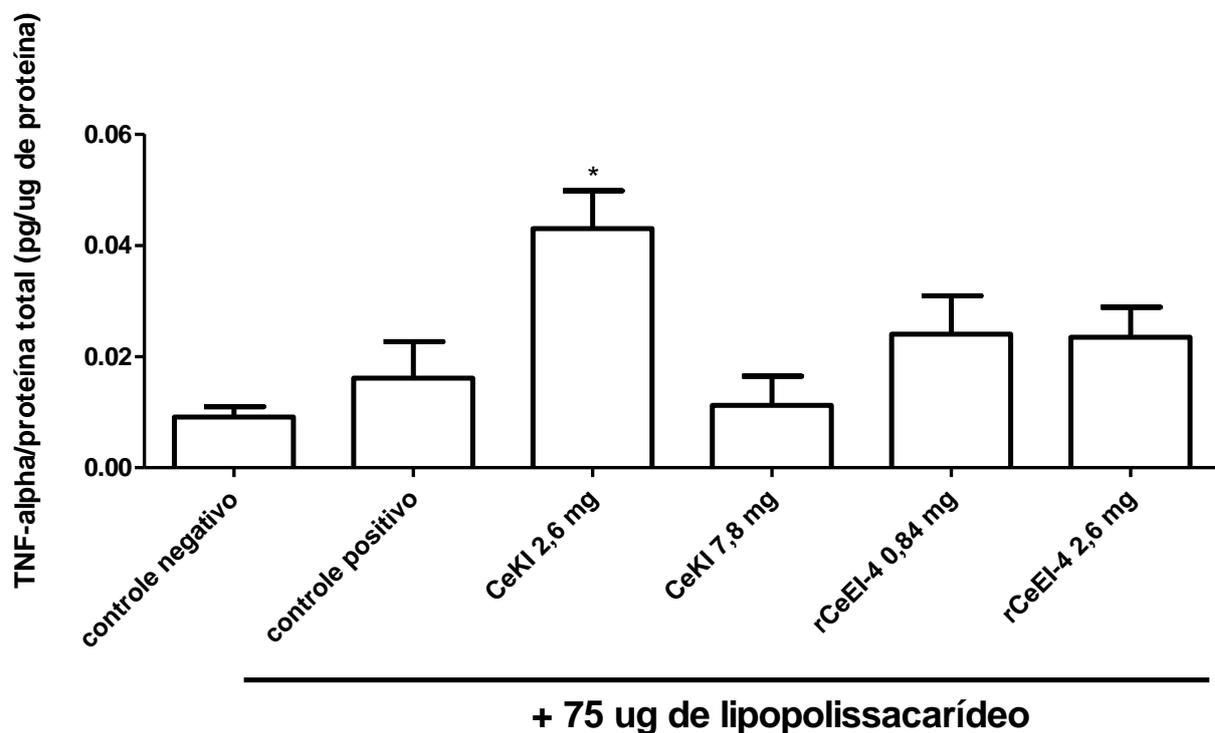


FIGURA 38: Determinação da quantidade de TNF- α nos BAL dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados e foi feita a lavagem bronqueoalveolar com tampão fosfato 10 mM pH 7,4. Utilizando-se o kit *Quantikine immunoassay* de TNF- α ; foram dosadas as quantidades de interleucina em 50 μ l da amostra, corrigidas pela concentração de proteína nas amostras e comparadas à curva padrão.

Controle negativo \Leftrightarrow tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo \Leftrightarrow 75 μ g de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg \Leftrightarrow 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg \Leftrightarrow 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg \Leftrightarrow 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg \Leftrightarrow 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão.

*** Houve diferença significativa entre o grupo e o grupo controle negativo ($p < 0,05$).**

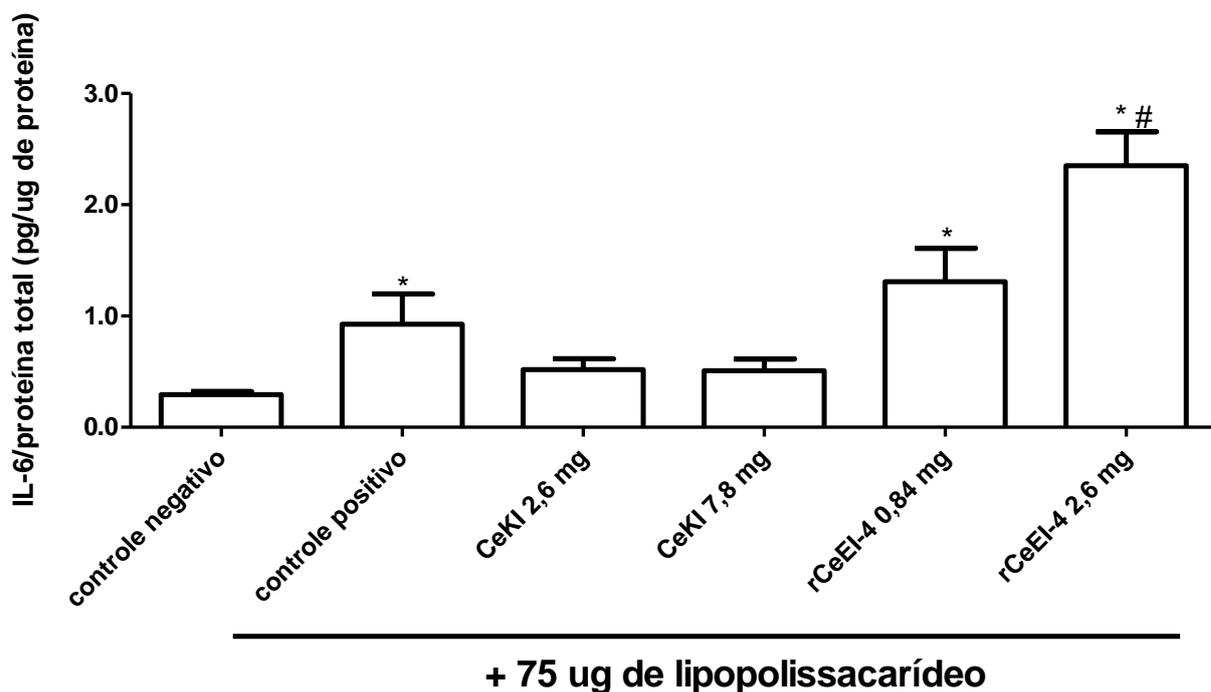


FIGURA 39: Determinação da quantidade de IL-6 nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Utilizando-se o kit *Quantikine immunoassay* de IL-6, foram dosadas as quantidades de interleucina em 50 µl da amostra diluída 10 vezes, corrigidas pela concentração de proteína nas amostras e comparadas à curva padrão.

Controle negativo ⇔ tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo ⇔ 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg ⇔ 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg ⇔ 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg ⇔ 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 µg de LPS em tampão.

Houve diferença significativa entre os grupos e o * grupo controle negativo e & grupos tratados com CeKI ($p < 0,05$). # Houve um aumento estatístico no título de IL-6 no grupo tratado com rCeEI quando comparados ao grupo controle positivo ($p < 0,05$) e o grupo controle positivo.

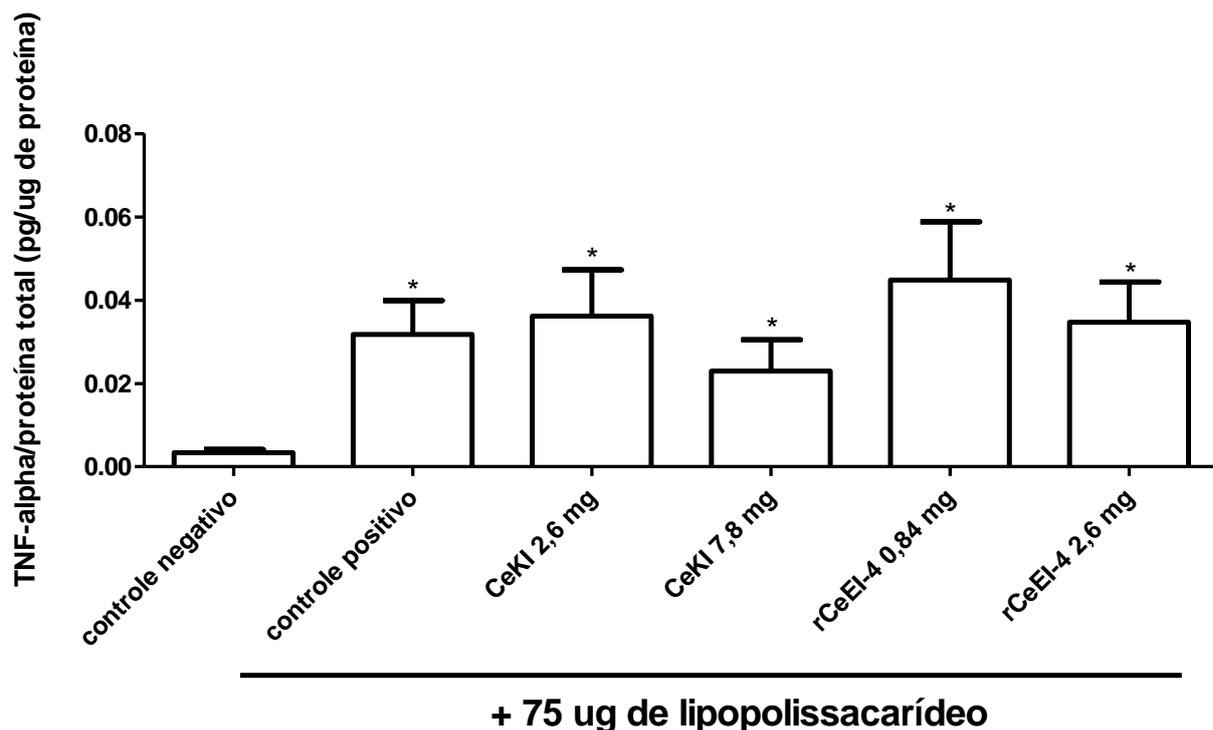


FIGURA 40: Determinação da quantidade de TNF- α nos pulmões dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

Os ratos receberam o tratamento segundo MÉTODOS. Após 6 h, os animais foram eutanasiados, os pulmões foram retirados, processados e centrifugados por 30 min a 3000xg a 4°C. Utilizando-se o kit *Quantikine immunoassay* de TNF- α , foram dosadas as quantidades de interleucina em 50 μ l da amostra diluída 10 vezes, corrigidas pela concentração de proteína nas amostras e comparadas à curva padrão.

Controle negativo \Leftrightarrow tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo \Leftrightarrow 75 μ g de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg \Leftrightarrow 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg \Leftrightarrow 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg \Leftrightarrow 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg \Leftrightarrow 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão.

*** Houve diferença significativa entre os grupos tratados em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).**

TABELA V: Razão de TNF- α /IL-10 nos BAL e no pulmão dos animais submetidos ao modelo de edema pulmonar.

	controle negativo	controle positivo LPS	CeKI 2,6 mg LPS	CeKI 7,8 mg LPS	rCeEI 0,84 mg LPS	rCeEI 2,6 mg LPS
BAL	4,21 \pm 1,56	11,1 \pm 12,1	31,8 \pm 32,1	29,0 \pm 22,0	47,1 \pm 37,0*	50,4 \pm 9,86*
Pulmão	0,21 \pm 0,11	1,83 \pm 0,69	1,95 \pm 1,59*	1,59 \pm 1,13	2,23 \pm 1,79 [#]	3,15 \pm 3,40 [#]

Após a correção das dosagens das quantidades de TNF- α e IL-10 pela quantidade de proteína nas amostras e comparadas à curva padrão, dividiu-se a concentração de TNF- α pela concentração de IL-10.

Controle negativo \Leftrightarrow tampão Tris 50 mM pH 8,0;

Controle positivo \Leftrightarrow 75 μ g de LPS em tampão;

CeKI 2,6 mg \Leftrightarrow 2,6 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

CeKI 7,8 mg \Leftrightarrow 7,8 mg de CeKI em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

rCeEI-4 0,8 mg \Leftrightarrow 0,8 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão;

rCeEI-4 2,6 mg \Leftrightarrow 2,6 mg de rCeEI-4 em tampão, seguidos de 75 μ g de LPS em tampão.

*** Houve diferença significativa entre os grupos tratados com rCeEI, inibidor de EN e Cat G em relação ao grupo controle negativo nas amostras de BAL. # Houve aumento estatístico nos grupos tratados com inibidor rCeEI em relação ao grupo controle negativo no pulmão ($p < 0,05$).**

5.11 Caracterização da cultura de epitélio pulmonar do tipo II

5.11.1 Identificação da cultura de células pulmonares

A incubação das células com o anticorpo anti-proteína C associada a surfactante pulmonar permitiu identificar a presença dessa proteína em aproximadamente 100% das células cultivadas, indicando se tratar de células do epitélio pulmonar do tipo II. Já nos controles, não houve reconhecimento da proteína (**FIGURA 41**).

5.11.2 Avaliação da viabilidade das células pulmonares do tipo II no decorrer do tempo - curva de crescimento

Acompanhando a viabilidade das células por quinze dias, verificou-se que nos três primeiros dias, a porcentagem de células viáveis foi maior; após esse período houve aumento na porcentagem de células mortas. Sabendo disso, todos os experimentos foram feitos nesse intervalo de tempo.

5.11.3 Avaliação do efeito da EN nas células pulmonares

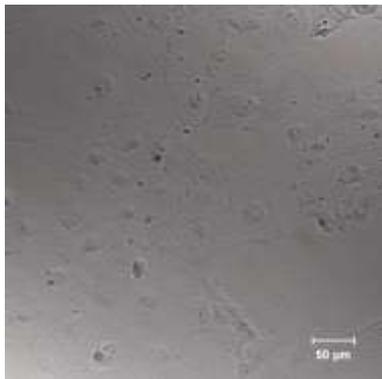
Ao se analisar a viabilidade celular, foi observado que a EN induziu morte celular. Também foi observado que, mesmo com baixas concentrações de EN, houve uma diminuição na proliferação celular (**FIGURA 42**). Então, resolveu-se avaliar se a morte celular observada era por apoptose. Para isso, usou-se como controle de morte por apoptose a estaurosporina. Foi observado que a EN induziu fragmentação do DNA nas células pulmonares do tipo II de rato (**FIGURA 43**), de forma semelhante à estaurosporina.

A)



Controles da reação de imunofluorescência

B)



C)

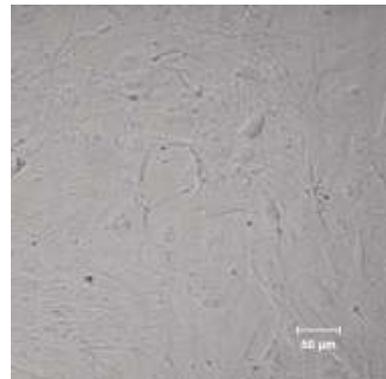


FIGURA 41: Identificação das células do epitélio alveolar do tipo II por anticorpo anti-proteína C associada a surfactante pulmonar.

As células epiteliais, extraídas dos pulmões de ratos Wistar e separadas por gradiente de Histopaque 1,077, foram fixadas em paraformaldeído 3% e permeabilizadas com Triton X-100 0,1%. Após bloqueamento dos sítios inespecíficos com albumina sérica bovina 1% e Tween 20 1%, as células passaram pelos seguintes processos: A) foram incubadas com o anticorpo anti-proteína C associada a surfactante pulmonar e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário (anti-coelho conjugado com Cy3); B) foram incubadas somente com o anticorpo secundário; C) não foram incubadas com anticorpos. As células foram analisadas por microscopia confocal num Axiovert 100M, e aumento de 20x.

A) A proteína C associada a surfactante pulmonar foi reconhecida pelo seu anticorpo demonstrando que se tratava de células do epitélio pulmonar do tipo II. B e C) Não houve inespecificidade do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Cy3.

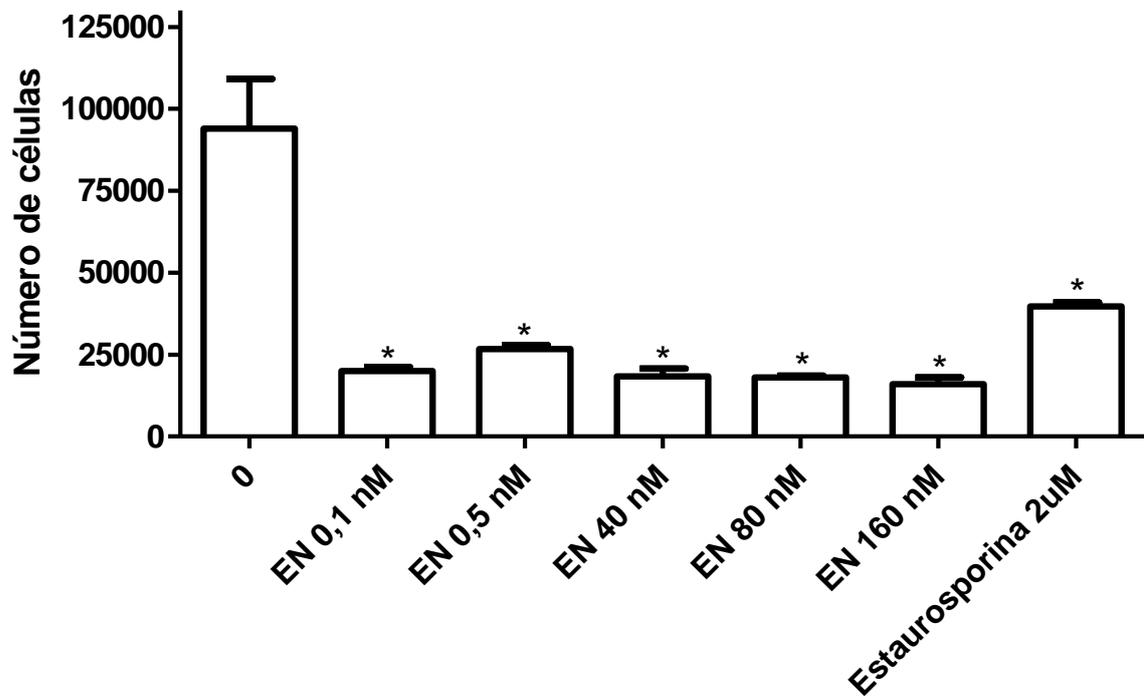


FIGURA 42: Proliferação das células pulmonares do tipo II tratadas com EN.

As células pulmonares do tipo II, extraídas dos pulmões de ratos Wistar foram cultivadas em meio DMEM, contendo soro fetal bovino 10% por 24 h. Após esse período, elas foram tratadas com EN, diluída em meio DMEM na ausência de soro, nas concentrações indicadas. Após 4 h de incubação com MTT a 37°C e CO₂ 5%, o sobrenadante foi retirado e tratado com DMSO; após 5 min fez-se a leitura da absorbância em 570 nm

* Houve alteração significativa na proliferação das células com a adição de EN.

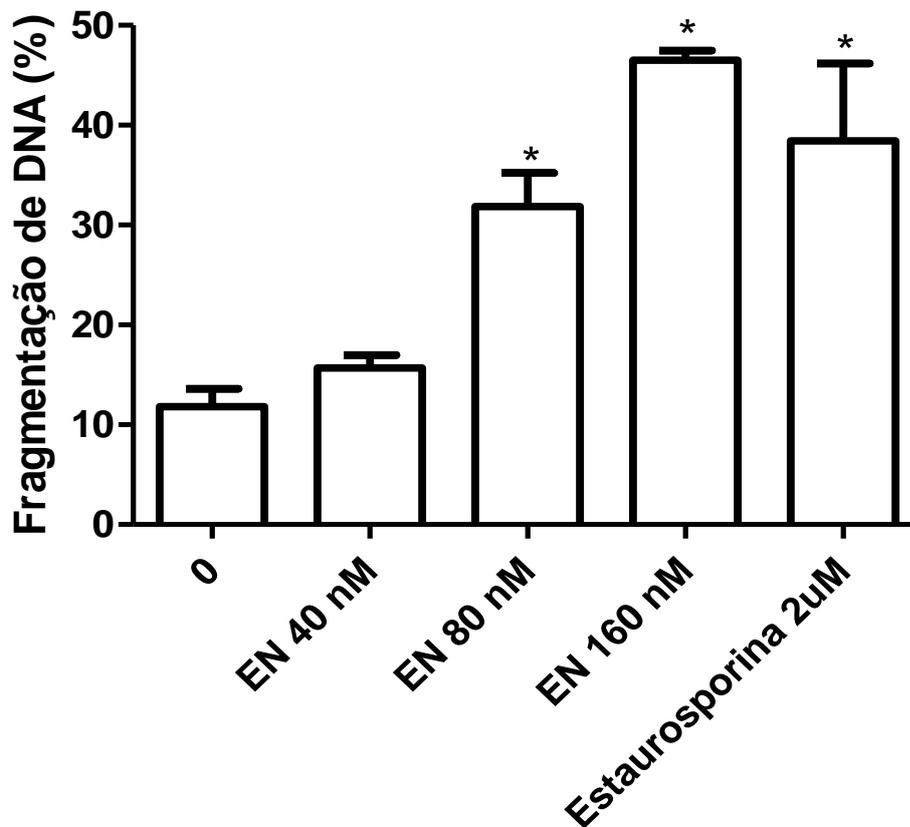


FIGURA 43: Fragmentação de DNA das células pulmonares do tipo II tratadas com EN.

As células, extraídas dos pulmões de ratos Wistar foram cultivadas em meio DMEM, contendo soro fetal bovino 10% por 24 h. Após esse período, elas foram tratadas com EN, diluída em meio DMEM na ausência de soro, nas concentrações indicadas. Para a avaliação da fragmentação nuclear, o *pellet* foi suspenso em etanol 70% por 2 h. Após uma centrifugação, o *pellet* foi tratado com Triton-X 100 0,1%, iodeto de propídeo 20 µg/ml e RNAse A 200 µg/ml. As amostras foram mantidas no escuro por 30 min a 4°C e, em seguida, analisadas por citometria de fluxo.

*** Houve alteração significativa na fragmentação do DNA das células com a adição de EN, ou seja, EN induz a morte desse tipo celular.**

6. DISCUSSÃO

Os tecidos vegetais com alto valor nutricional, como sementes e raízes, possuem grandes quantidades de proteínas (Hara *et al.*, 1989; Antcheva *et al.*, 1996; Batista *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 2006), sendo frequentes alvos de predadores (Christeller, 2005). A função dessas proteínas para a planta ainda não é completamente definida; porém, acredita-se que o seu papel seja de defesa (Christeller, 2005; Lawrence, Koundal, 2002).

No nosso laboratório, já foram identificados nas sementes de *C. echinata* algumas peptidases (Praxedes-Gracia, 2008; Polli *et al.*, 2008) e inibidores de serino e cisteinopeptidases (Cruz-Silva *et al.*, 2004; Cruz-Silva *et al.*, 2005; Cruz-Silva *et al.*, 2010).

Na primeira etapa desse trabalho, foi feita a clonagem de fragmentos de DNA que codificam os inibidores CeEIs, a expressão e a caracterização desses inibidores recombinantes, bem como a clonagem de fragmentos menores de CeEI, contendo o sítio reativo desse inibidor.

Para a clonagem de fragmentos de DNA do CeEI, inicialmente foi feita a extração do RNA total, a partir de sementes verdes de *C. echinata*, já que os RNAs mensageiros para os inibidores da família Kunitz são altamente expressos durante o estágio de maturação no desenvolvimento das sementes (Vodkin, Scandalios, 1981; Hammond *et al.*, 1984). Após a amplificação do fragmento com oligonucleotídeo degenerado, contendo a sequência da porção N-terminal da molécula do CeEI, foi feita a clonagem desse fragmento de DNA (700 pb) codificante para CeEI, obtendo-se dois clones com as sequências de inibidores de peptidases da família Kunitz, mas com alguns aminoácidos diferentes, o que sugere a existência de isoformas do inibidor. Essas substituições de aminoácidos na sequência da proteína também podem ser atribuídas à existência de polimorfismo dos genes dos inibidores (Kouzuma *et al.*, 1997; Kuramitsu *et al.*, 1996); além disso, muitos inibidores estão presentes como pequenas famílias de genes, com especificidades alteradas entre seus membros (Christeller, 2005). As sequências de aminoácidos deduzidas da sequência de nucleotídeos, obtidas para os CeEIs, apresentaram similaridade com as de outros inibidores de peptidases do tipo Kunitz, mostrando um alinhamento perfeito das pontes de dissulfeto e conservação de resíduos de aminoácidos da porção N-terminal da proteína.

Para a expressão dos CeEI recombinantes (rCeEI), inicialmente foi usada a bactéria *E.coli* cepa BL21(trxB)pLys; porém, não se obteve sucesso. Apesar da confirmação da inserção correta dos fragmentos de DNAs de CeEI, por PCR em gel de agarose e da presença de bandas correspondente às massas moleculares dos rCeEIs em SDS-PAGE, o material não apresentou atividade inibitória (dados não mostrados). É possível que as bactérias tenham expressado as proteínas desestruturadas, resultando em moléculas inativas.

Para se conseguir material com atividade inibitória, foi substituída a *E. coli* cepa BL21(trxB)pLys, que é mutante para uma tiredoxina redutase (trxB) (Derman *et al.*, 1993), pela bactéria *E. coli* cepa Rosetta Gami que é mutante para duas tiredoxinas redutases (trxB/gor), que são as enzimas-chave para a maioria das reações de redução, facilitando a formação de pontes de dissulfeto das proteínas expressas no citoplasma da *E. coli* (Dubendorff, Studier, 1991).

Proteínas expressas em bactérias apresentam-se, em pequena porcentagem, na forma solúvel e monomérica, enquanto que mais de 95% delas encontram-se na forma de corpos de inclusão, que são agregados insolúveis de proteínas enoveladas incorretamente e que geralmente representam mais de 50% das proteínas celulares. Esses agregados proteicos insolúveis ocorrem devido à alta quantidade de proteínas heterólogas no citoplasma bacteriano, que promovem interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas intermoleculares (Futami *et al.*, 2000). A ocorrência dos agregados proteicos prejudica a obtenção da proteína de interesse na forma solúvel e em sua conformação correta, sendo necessárias etapas adicionais para a sua recuperação, o que resulta na diminuição do rendimento da expressão. Estudos demonstraram que IPTG, nas concentrações de 0,010 a 0,10 mM e por período longo de indução, poderia aumentar a solubilidade das proteínas e, conseqüentemente, o rendimento (Blackwell, Horgan, 1991). As colônias de bactérias contendo o DNA de CeEIs induzidas por IPTG expressaram grande quantidade de proteínas com massa moleculares de aproximadamente 23 kDa, tamanho esperado para os inibidores. Já as colônias de bactéria não-induzidas não expressaram proteínas nos tamanhos esperados.

Após a expressão, os inibidores recombinantes foram purificados e caracterizados. Para a purificação, inicialmente, aproveitou-se a presença da cauda de histidina inserida à proteína, quando se utiliza o vetor pET-14b, para se fazer uma cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. Os CeEIs recombinantes foram eluídos com imidazol 0,50 M, sendo o resultado bastante satisfatório, pois quase

todos os contaminantes foram removidos. O segundo passo de purificação foi uma cromatografia de troca iônica (coluna HiTrap Q) porque os pontos isoelétricos (pIs) teóricos calculados são distintos (para o rCeEI-4 o valor é de 5,17 e para o rCeEI-5, 4,66); pelo valor menor do pI, o rCeEI-5 foi eluído em força iônica maior. Após essa etapa, os inibidores rCeEI-4 e rCeEI-5 apresentaram alto grau de pureza.

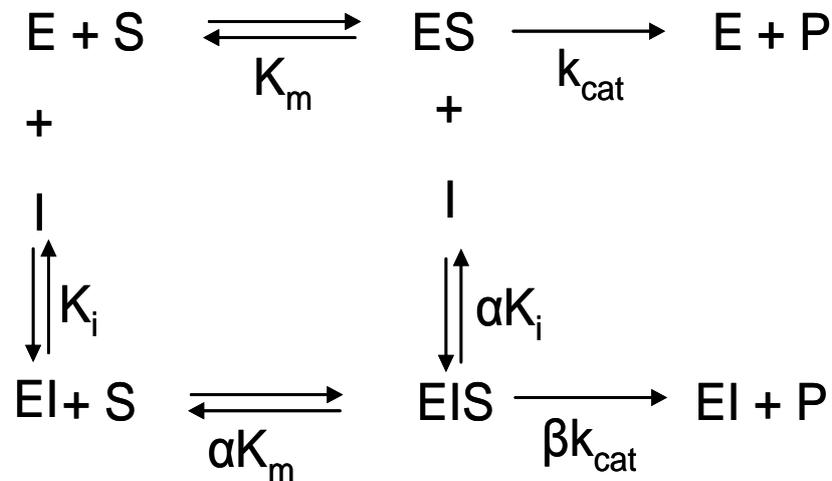
A capacidade inibitória dessas proteínas foi avaliada em ensaios *in vitro*, utilizando-se a hidrólise de substratos cromogênicos. rCeEI-4 e rCeEI-5 foram capazes de inibir, nessa ordem crescente de afinidade, tripsina, quimotripsina, Cat G, HuPK e EN; porém, foram ineficazes na inibição da EP, calicreína renal e subtilisina A. De um modo geral, o rCeEI-4 apresentou maior afinidade pelas serinopeptidases testadas do que o rCeEI-5. Além disso, rCeEI-5 conseguiu inibir fortemente a EN, diferentemente da quimotripsina, sem inibir a EP, o que confere uma importante especificidade para a EN; tal fato é importante para o estudo dessas enzimas em patologias, já que esses inibidores apresentam alta homologia mas com diferentes especificidades.

Comparando esses inibidores recombinantes com o inibidor nativo CeKI, purificado de sementes de pau-brasil, tanto os rCeEI-4 e rCeEI-5 quanto o CeKI são capazes de inibir a calicreína plasmática, com K_i na faixa de nM; entretanto, diferem quanto à inibição de EN, já que somente os recombinantes foram capazes de inibi-la; já havíamos publicado que CeKI inibiu plasmina ($K_i=0,18$ nM), fator XIIa ($K_i=0,18$ nM), fator Xa ($K_i=0,49$ nM) e HuPK ($K_i=3,1$ nM) (Cruz-Silva *et al.*, 2004); ele também inibiu Cat G ($K_i = 2,1$ μ M).

A princípio, um melhor conhecimento sobre a interação da enzima com o substrato e o inibidor pode ser obtido avaliando-se a cinética da reação. Na hidrólise do substrato sintético MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan por EN, experimentalmente, foram obtidos valores de K_m (0,080 mM), k_{cat} ($9,6$ s^{-1}) e de eficiência catalítica (120 $mM^{-1}s^{-1}$) muito próximos aos descritos na literatura (Nakajima *et al.*, 1979).

Classicamente, os inibidores do tipo Kunitz têm suas constantes de inibição calculadas pela metodologia de Morrison, por se tratar de uma inibição competitiva. Nesse trabalho, apesar de toda a caracterização dos inibidores recombinantes sobre a ação de EN ter sido feita, utilizando-se a equação de Morrison, deve-se levar em conta que esse não é o tipo certo de inibição, pois, diferentemente do que a literatura descreve, o tipo de inibição nesse caso é parcial mista e não competitiva.

Para uma melhor compreensão do fenômeno descrito, têm-se o seguinte esquema de reações:



onde E é a enzima (EN), S é o substrato (MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan), I é o inibidor (rCeEI), ES é complexo enzima-substrato, EI é o complexo enzima-inibidor, EIS complexo enzima-inibidor-substrato e P é o produto formado (p-nitroanilina). Como constantes têm-se que K_m é a constante de Michaelis-Menten, K_i é a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor e k_{cat} é a constante catalítica da formação do produto; α e β são os fatores de distúrbio dessas constantes.

Quando os dados dos inibidores recombinantes são analisados, tem-se que tanto o α da reação com o rCeEI-4 quanto o da reação com o rCeEI-5 estavam na faixa $1 < \alpha < \infty$, podendo-se concluir que a inibição das reações podem ser classificadas como do tipo mista, ou seja, uma forma de inibição não competitiva (Segel, 1993).

Entretanto, como os valores de β nas reações de ambos os inibidores foram diferentes de zero, o complexo EIS nas duas reações é capaz de formar o produto, caracterizando uma inibição parcial. No caso do rCeEI-4, a formação de produto ocorre numa velocidade igual à da reação sem inibidor, pois $\beta=1$; já a reação com o rCeEI-5 é cerca de 60% mais lenta do que a reação sem inibidor ($\beta=0,6$). É interessante lembrar que, em ambos os casos, a inibição é feita pela reação do inibidor com a enzima ou com o complexo ES.

Embora os valores de K_i da inibição da EN pelos inibidores recombinantes sejam numericamente iguais (por volta de 0,70 nM) e eles se comportem cineticamente de maneira semelhante ($1 < \alpha < \infty$ e $0 < \beta < 1$), na verdade, seus comportamentos cinéticos

não são iguais (para rCeEI-4 $\alpha K_i = 7,4 \text{ nM}$ e $\beta k_{cat} = 193 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; para rCeEI-5 $\alpha K_i = 1,8 \text{ nM}$ e $\beta k_{cat} = 116 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Observando-se a reação como um todo, a afinidade do complexo EN-substrato pelo rCeEI-5 é maior ($\alpha K_i = 1,8 \text{ nM}$) do que pelo rCeEI-4 ($\alpha K_i = 7,4 \text{ nM}$); também, a afinidade do substrato pelo complexo EN-rCeEI-5 ($\alpha K_m = 0,2 \text{ mM}$) é maior do que pelo EN-rCeEI-4 ($\alpha K_m = 0,8 \text{ mM}$). Além disso, como já foi discutido anteriormente, a reação envolvendo o rCeEI-5 é cerca de 60% mais lenta do que a com o rCeEI-4. Poderíamos concluir, então, que apesar da enzima, substrato e inibidor terem uma maior afinidade para formar o complexo EN-substrato-rCeEI-5 do que o EN-substrato-rCeEI-4, a formação do produto é mais rápida no caso do rCeEI-4, podendo haver um efeito compensatório na ação dos dois inibidores.

Num contexto mais amplo, trocas de aminoácidos na proteína, não necessariamente no sítio reativo, podem contribuir para a melhoria na afinidade e especificidade de cada uma das isoformas do inibidor. É de grande importância a caracterização das diferenças bioquímicas e biofísicas de duas proteínas com alta similaridade; pois, além de permitir a avaliação de inibidores com especificidades diferentes, poder-se-ia conhecer melhor a relação enzima-inibidor; também poderia servir de subsídio para a melhor compreensão da influência da estrutura primária de uma proteína na sua atividade, já que esses iso-inibidores não apresentam diferenças no sítio reativo, nem em sua estrutura terciária (Strop *et al.*, 1983; Jonakova *et al.*, 1992).

Para um melhor entendimento dessa interação proteína-proteína (EN-inibidor) e da troca ou falta de certos aminoácidos, foi de nosso interesse identificar a menor seqüência de aminoácidos do inibidor que apresentasse atividade inibitória sobre EN. Além disso, um peptídeo pequeno poderia evitar a ocorrência de uma eventual produção de anticorpos nos animais, em testes *in vivo* com esses inibidores proteicos, ou uma sobrecarga renal já que as moléculas dessa proteína são relativamente grandes para sua depuração.

Primeiramente, a partir da seqüência de aminoácidos da proteína inteira foi feito um modelo tridimensional para o inibidor CeEI, utilizando-se estruturas terciárias de proteínas similares como modelo e um programa de computador. Avaliando-se as estruturas primária e terciária, foram delimitados três fragmentos da estrutura da proteína inteira. Assim, foi sintetizado um primeiro fragmento, de apenas 23 aminoácidos (fragmento 55), delimitado pelos aminoácidos P⁵⁵ e L⁷⁵ da proteína, que

compreendia a região do sítio reativo e mais alguns aminoácidos adjacentes a ele. No entanto, não foi identificada atividade inibitória sobre EN; por isso, não demos continuidade aos testes com esse fragmento.

Foram, então, construídos oligonucleotídeos para a clonagem de outros dois fragmentos: o 36, delimitado pelos aminoácidos N³⁶ e S⁸⁸, e o fragmento 46, entre os aminoácidos S⁴⁶ e L⁷⁵. Os fragmentos continham a região do sítio reativo, sendo que o fragmento 36 também continha uma ponte de dissulfeto.

Durante o processo de clonagem desses fragmentos, surgiram problemas, como o crescimento mais demorado das bactérias e a reduzida expressão das proteínas com baixa massa molecular e alta instabilidade. Além disso, devido ao baixo rendimento, pouco inibidor era expresso em relação às proteínas da própria bactéria, o que dificultou a purificação e a identificação por SDS-PAGE. Mesmo assim, como o material apresentava atividade inibitória sobre EN, logo após a expressão dos fragmentos 36 e 46 do inibidor, foi medida a concentração das soluções desses fragmentos ([36] = 0,3 nM e [46] = 20 nM) e foram feitas purificações e caracterizações parciais. O fragmento 55 não inibiu EN.

Para a purificação dos fragmentos 36 e 46, aproveitando novamente a presença da cauda de histidina inserida à proteína por ocasião de sua clonagem no vetor pET-26b, foi usada a cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. O fragmento 46 de CeEI recombinante foi eluído com imidazol 0,50 M, sendo esse resultado bastante satisfatório, pois quase todos os contaminantes foram removidos. Já o fragmento 36 foi eluído com imidazol 0,02 M, o que não era esperado, uma vez que a cauda de histidina resulta em uma forte ligação ao Ni⁺⁺ da resina. De qualquer forma, esse passo foi importante para a purificação, pois foi obtido o fragmento, separado de uma grande quantidade de proteínas que não interagiram com a resina.

O segundo passo de purificação dos fragmentos foi uma cromatografia de troca iônica (coluna HiTrap Q). Para o fragmento 36, a purificação foi interrompida nessa etapa, por perda da atividade inibitória sobre EN.

A purificação do fragmento 46 seguiu com uma filtração em gel (coluna Superdex G-30). Infelizmente, o fragmento foi eluído tardiamente com os sais e, quando se tentou separar os sais do fragmento, por uma filtração em gel em coluna PD-10, já não havia mais atividade inibitória detectável. Apesar de não ter mais atividade, esse material foi submetido a uma cromatografia de fase reversa; do material eluído, a seqüência dos

primeiros dez aminoácidos da porção N-terminal foi confirmada, por degradação de Edman, e a massa molecular de 3696 Da por espectrometria de massa em LC/ESI-MS.

Como não foi obtida quantidade suficiente de fragmentos de CeEI puros por expressão com bactérias, utilizou-se a levedura *Pichia pastoris* para expressar o fragmento 36 já que, nesse caso, a maior quantidade de proteína produzida é secretada devido à presença de um sinal que encaminha a proteína expressa para o meio de cultura. Na sua trajetória pela via de secreção, a proteína passa por alguns eventos pós-translacionais, como maturação proteolítica, glicosilação e formação de pontes de dissulfeto (Cregg *et al.*, 1993). Além disso, para as proteínas de baixa massa molecular, é comum que outros organismos de expressão, como as bactérias, secretem baixos níveis da proteína nativa; logo, a secreção dessa proteína pela *P. pastoris* deveria representar um aumento no rendimento da expressão (Cregg *et al.*, 1993).

Apesar das vantagens para a expressão de proteínas, utilizando-se *P. pastoris*, no caso do fragmento 36 do CeEI, obteve-se pouca quantidade de um material instável; no entanto, deve-se ressaltar que, a pequena quantidade obtida do fragmento 36 expresso por levedura (125 nM) foi muito maior que a obtida por bactéria (0,3 nM); além disso, a atividade inibitória sobre EN foi reduzida. A afinidade do fragmento 46 expresso em leveduras sobre a enzima foi cerca de 100 vezes maior do que a do fragmento 46 expresso em bactérias. Isso se deve ao fato de que as leveduras são capazes de fazer as modificações pós-translacionais em proteínas, já que apresentam retículos endoplasmáticos e algumas enzimas modificadoras como glicosilases e dissulfeto isomerase. No caso do fragmento 46 expresso em levedura, a presença de dissulfeto isomerase promoveu a formação de pontes de dissulfeto melhorando a estabilidade e a afinidade do fragmento pela enzima. Isso corrobora ainda mais para a hipótese de que o fragmento do inibidor é instável, porque a sequência de seus aminoácidos não é suficiente para prover a estrutura necessária para a interação com a EN.

Como no caso da expressão em *P. pastoris* o vetor não apresenta os códons para a cauda de histidina, o primeiro passo de purificação do fragmento 36, expresso por levedura, foi a filtração em gel em coluna Superdex G-75, seguida de uma cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q. Infelizmente, o fragmento de CeEI se apresentou instável, o que dificultou a purificação. Por SDS-PAGE foram verificados o grau de pureza e a massa molecular do fragmento; entretanto, não foi possível

identificar a banda correspondente à massa teórica dos fragmentos (dados não mostrados). Aqui também, foi usada a cromatografia de fase reversa, seguida do seqüenciamento da porção N-terminal, para confirmar a presença do fragmento desejado.

Estudos recentes demonstraram a importância não só do sítio reativo, mas também de outros aminoácidos adjacentes ou não ao sítio reativo, para a estabilidade do inibidor e inibição da enzima. Entretanto, ainda não há um consenso em quais aminoácidos e o quanto eles podem interferir na formação do complexo enzima-inibidor. Alguns autores descrevem a importância entre dez (Plotnick *et al.*, 1997) e doze aminoácidos (Fodor *et al.*, 2005), para a estabilidade do complexo, com conseqüente atividade inibitória. De qualquer forma, sabe-se que há interações importantes de outros aminoácidos que não estão no sítio reativo; porém, pouco se sabe sobre as outras regiões do inibidor fora dessa seqüência de aminoácidos pré-determinada. Além de interagir com partes da enzima, regiões mais afastadas do inibidor também são importantes para manter a sua estabilidade. Forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes de dissulfeto são importantes para a interação enzima-inibidor e estabilização do inibidor, além de regerem a estrutura terciária do inibidor. Sendo assim, a instabilidade e a perda da atividade inibitória dos fragmentos 55 e 46, nos quais não existia nenhuma ligação forte para estabilizar a estrutura, poderia ser explicada. Poder-se-ia dizer, ainda, que faltam aminoácidos responsáveis para a formação de estrutura secundária importante, como alfa hélices e folhas betas, para a interação do inibidor com a enzima e sua conseqüente inibição (Shin *et al.*, 2005). Com isso, pode-se concluir que, para ter atividade inibitória e estabilidade da proteína, é necessária uma seqüência maior da molécula do CeEI, que não foi contemplada nos nossos estudos. Testes preliminares indicaram que esses fragmentos de CeEI não são reconhecidos pelo anticorpo anti-rCeEI (dados nos mostrados).

Como não se obteve sucesso com os fragmentos de inibidor, os testes *in vivo* foram feitos com os inibidores proteicos íntegros. O efeito de inibidores proteicos tem sido verificado em diversos tipos de modelos de algumas doenças e processos fisiológicos de animais e vegetais (Neuhof *et al.*, 2003; Lopes-Ferreira *et al.*, 2004; Malavazi-Piza *et al.*, 2004). Sabendo-se que, em modelos de edema pulmonar, há uma importante participação de EN com contribuição de Cat G e que, na verdade, ainda não se sabe sobre a pontual participação de cada uma dessas enzimas, é justificado o uso

do CeKI (Cruz Silva *et al.*, 2004) e CeEI para compreender melhor a participação de cada uma dessas enzimas nessa patologia. Como já foi dito, CeEI é capaz de inibir tanto EN quanto Cat G, enquanto que CeKI só inibe Cat G. É importante ressaltar o fato de que ambos os inibidores sejam capazes de inibir a HuPK com a mesma afinidade (para o CeKI a constante de dissociação é de 3,1 nM e para rCeEI é de 1,0 nM).

Modelos de edema pulmonar têm sido estabelecidos e caracterizados (Kishima *et al.*, 1998; Hagio *et al.*, 2001; Neuhof *et al.*, 2003). Para o modelo de edema pulmonar, a administração intratraqueal de lipopolissacarídeo (LPS), ou sua inalação, deve induzir uma resposta inflamatória caracterizada por infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na matriz extracelular e pela liberação de mediadores que têm um papel fundamental no dano pulmonar. Em geral, nos modelos que têm sido propostos, são analisados três parâmetros: a atividade de mieloperoxidase (MPO) no parênquima, que reflete o acúmulo de PMN no pulmão, a presença de PMN e citocinas no lavado bronqueoaveolar (BAL), que refletem seu extravasamento, e uma estimativa de hemoglobina no BAL, como marcador de dano hemorrágico no tecido, em virtude da degranulação de PMN (Asti *et al.*, 2000).

Analisando-se os dados da literatura, pode-se verificar uma grande divergência nesse assunto. Primeiramente, porque não há um protocolo padrão, sendo avaliados diferentes animais, incluindo humanos, com diferentes compostos para a indução da doença, diferentes períodos para a avaliação das enzimas, além de diferentes formas de detecção das enzimas. Talvez todas essas variáveis possam interferir na resposta esperada e, por isso, há grandes controvérsias no assunto, já que se trata de uma síndrome com ampla etiologia e progressão. Além disso, a avaliação do BAL é um parâmetro relativamente novo, quando comparada aos métodos clássicos de avaliação do pulmão, como a biópsia pulmonar, cuja análise ainda é controversa (European Society of Pneumology Task Group on BAL, 1989). O BAL fornece importantes informações sobre as células e as peptidases liberadas pela via pulmonar, o que indiretamente descreve as condições do parênquima pulmonar (American Thoracic Society, 1990). Por isso, seria interessante a busca de um marcador proteico no BAL que refletisse o que é encontrado no pulmão, pois o BAL provê acesso direto ao alvéolo pulmonar o que facilita significativamente o entendimento do processo da história natural da doença (Bhatia, Moochhala, 2004).

De maneira geral, diferentemente do pulmão normal, no órgão com edema ocorre um aumento da permeabilidade a proteínas maiores, o que reflete a perda da restrição às moléculas que podem atravessar a membrana plasmática; logo, as proteínas podem estar distribuídas de forma similar entre plasma e BAL. O extravasamento de proteínas para o espaço alveolar é aceito como indicativo de edema pulmonar, mas poucos são os trabalhos que quantificam as proteínas do BAL (Kips *et al.*, 1993; Vachon *et al.*, 2002); talvez, porque um extravasamento detectável aconteça somente em fases mais avançadas da doença, nas quais ocorre o comprometimento do epitélio alveolar. Em relação à quantidade de proteínas no BAL, no presente trabalho foi mostrado que os grupos não apresentaram diferenças. Além disso, em SDS-PAGE não foram verificadas diferenças na quantidade ou na qualidade das bandas identificadas nos BAL dos animais dos diferentes grupos, e também não foram observadas proteínas com massas similares à do CeKI ou do rCeEI-4 nos grupos que receberam um dos inibidores, o que sugeriria extravasamento de proteínas, incluindo do inibidor aplicado.

O aumento na concentração de PMN, principalmente a de neutrófilos, já foi descrito em diversos modelos de doenças pulmonares. Em geral, esse aumento pode ser visto de quatro até oito horas após a aplicação ou inalação de LPS ou de bactérias gram-negativas (Shimada *et al.*, 2000; Asti *et al.*, 2000). Jansson e colaboradores (2005) demonstraram que a curva do efeito da concentração de LPS em relação à migração de PMN começa a apresentar um efeito dependente da concentração com 100 µg de LPS/kg do animal. No modelo usado nesse trabalho, pode-se verificar o aumento na concentração dessas células no BAL dos animais tratados com 75 µg de LPS/animal, o que corresponderia a 250 µg de LPS/kg do animal. Já os animais tratados com inibidores não apresentaram extravasamento de PMN, com comportamento semelhante ao do controle negativo. Sendo assim, tais inibidores mostraram eficácia na diminuição do extravasamento de PMN para o BAL.

Para a complementação dos dados obtidos com PMN, mediu-se a atividade do tipo EN no BAL dos animais. Esse tipo de atividade nem sempre é visto em modelos de edema pulmonar (Idell *et al.*, 1985; Vachon *et al.*, 2002); mas, outros grupos de pesquisadores foram capazes de constatá-la (Kips *et al.*, 1993). Trabalhos demonstraram que, paralelamente ao aumento da concentração de EN no BAL, ocorre o aumento do seu inibidor, α_1 -antipeptidase, o que dificultaria a detecção da atividade da enzima nos modelos de edema pulmonar (Kawabata *et al.*, 2002). Nesse estudo,

nenhum dos animais apresentou atividade do tipo EN no BAL, nem quando foi utilizado um substrato fluorogênico para EN, que permitiria a detecção de pequenas quantidades dessa enzima num fluido. Entretanto, quando foram feitas reações com a enzima EN purificada, na presença ou ausência das amostras de BAL em volumes crescentes, verificou-se que a inibição da EN exógena aumentava com o aumento do volume de BAL, sugerindo a presença de inibidor de EN endógeno, o que pode contribuir para a não detecção desse tipo de atividade no BAL.

Outra forma de se detectar a presença de neutrófilos ativos é a dosagem de MPO. Apesar das amostras apresentarem atividade dessa enzima, houve diferenças significativas entre os grupos, somente quando os animais foram tratados com o inibidor de EN e Cat G, indicando uma quantidade menor de neutrófilos ativos, o que não acontece quando os animais são tratados somente com o inibidor de Cat G. Além disso, os animais tratados com rCeEI apresentam atividade de MPO menor do que o controle negativo, sugerindo uma inibição de células ativas basais. Sabe-se que atividade de MPO não é exclusiva de neutrófilos PMN, mas está presente também em precursores mielóides, como macrófagos ou monócitos (van der Veen *et al.*, 2009), ou seja, rCeEI poderia inibir a ativação dessas células também.

Ainda em relação ao BAL, houve diferença significativa nas dosagens da enzima conversora de angiotensina (ECA) entre os animais tratados e os não tratados. Apesar de não se conhecer a via de ação da ECA no desenvolvimento do edema, é provável que esteja ligada à formação de angiotensina II que agiria no pulmão, danificando-o (Marshall *et al.*, 2004; Lambert *et al.*, 2010). A ECA é amplamente distribuída na superfície do lúmen endotelial dos vasos sanguíneos e vem sendo utilizada como marcador de disfunção endotelial (Ryan *et al.*, 1976). Em 1985, Idell e colaboradores descreveram que a atividade de ECA no BAL de humanos poderia servir como marcador para edema pulmonar. Já é bem caracterizado o fato de que inibidores da ECA reduziram o edema pulmonar e que mutações no gene dessa enzima estão correlacionadas à intensidade do edema pulmonar.

Em nosso trabalho, demonstramos que existem diferentes atividades da ECA nos BAL provenientes de pulmões saudáveis ou comprometidos, o que poderia sugerir essa enzima como um marcador do edema. Entretanto, essa atividade não é mantida no parênquima pulmonar e parece não ser específica, já que o grupo tratado com 0,84 mg de rCeEI apresentou elevada atividade de ECA, sem apresentar o edema, contrariando a sugestão de Idell e colaboradores (1985), caracterizado pela atividade

de MPO no parênquima e a presença de PMN e citocinas no BAL. É importante lembrar que a concentração de 0,84 mg de rCeEI foi a menor concentração de inibidor utilizada nos experimentos, sugerindo que essa atividade possa estar relacionada à baixa inibição da enzima Cat G, já que as concentrações dos inibidores de Cat G e de EN são baixas; no entanto, é preciso lembrar que Cat G, mas não EN, é inibida por CeKI, presente nos grupos onde não foi observada atividade alta de ECA.

Recentemente, vem sendo descrito que ECA serviria como marcador da doença sarcoidose pulmonar (Safianowska *et al.*, 2001; Specks *et al.*, 1990), uma doença granulomatosa crônica de etiologia desconhecida. Entre as funções da ECA estão a conversão da angiotensina I em angiotensina do tipo II (Imai *et al.*, 2008) e a inativação de bradicinina (Ehrhart *et al.*, 2000). A angiotensina do tipo II é um produto ativo resultante do processamento da angiotensina I, cujas funções principais são: regulação do tônus vascular, proliferação e migração celular e também influência na pressão e na resposta de taquicardia (Lambert *et al.*, 2010). No pulmão, a angiotensina II tem algumas funções locais como proliferação de fibroblastos e aumento de depósito de colágeno (Marshall *et al.*, 2004; Lambert *et al.*, 2010).

Já a bradicinina está envolvida nos principais sinais de inflamação, como dor, calor, rubor e edema. Esse nonapeptídeo derivado do cininogênio é um potente vasodilatador que está relacionado com o remodelamento de matriz extracelular; age como agente mediador entre os sistemas calicreína-cinina e fibrinolítico, via ativador de plasminogênio tecidual, e do sistema calicreína-cinina e do complemento (Bryant, Shariat-Madar, 2009). Especificamente no pulmão, a bradicinina além de promover a vasodilatação endotelial, induz a contração das células musculares do epitélio pulmonar e estimula as células epiteliais a secretarem muco, ações que têm relevância nas doenças pulmonares (Barnes, 1992). Corroborando outros resultados (Marshall *et al.*, 2002; Arndt *et al.*, 2006), verificou-se um aumento na atividade do tipo ECA, concomitantemente ao aumento na concentração de cininas no grupo controle positivo, quando comparado ao grupo controle negativo. Nesse sentido, quando há a inflamação, ocorre maior liberação de bradicinina, juntamente com a sua enzima inativadora, a ECA. Essa situação é totalmente revertida com o tratamento dos animais com os inibidores CeKI e rCeEI. Como os inibidores não são capazes de inibir diretamente ECA (dados não mostrados), essa diminuição pode ser por efeito secundário ainda não estabelecido. É conhecido o fato de EN ser capaz de formar peptídeos do tipo cinina, como a bradicinina (Maeda *et al.*, 1999); sendo assim, com a

EN inibida esperar-se-ia encontrar uma menor formação de cinina. Em relação à Cat G, nada se sabe sobre sua ação na formação de cininas; porém, já se sabe que ela é capaz de clivar, no mesmo sítio de clivagem da ECA, a angiotensina I formando angiotensina II, o que contribuiria para a formação do edema (Licker, Morel, 1998); sendo assim, com a inibição de Cat G, há uma menor liberação de angiotensina II no pulmão o que diminuiria o dano causado nesse órgão.

A presença de cininas e as atividades de Cat G, HuPK, ECA, MPO e EN também foram estudadas no pulmão. Todas as atividades foram mais altas no parênquima pulmonar, quando comparadas aos outros fluidos biológicos, exceto a presença de cinina, cujos maiores valores foram encontrados no BAL. Apesar das cininas serem boas candidatas à marcação da doença, já que a sua presença foi mantida no BAL e no sangue, no pulmão, sua presença está diminuída e não há diferenças estatísticas entre os grupos, o que a descartaria como marcador universal da doença. Entretanto, quando comparada à facilidade em se analisar sangue ou BAL, em relação ao pulmão, pode-se dizer que as cininas poderiam ser um marcador sim, quando elevadas nesses fluidos, desde que esse fenômeno estivesse aliado a outros eventos. No pulmão, a atividade de ECA não teve diferenças entre os grupos. As atividades de Cat G, EN e MPO no parênquima demonstram haver um recrutamento e ativação de PMN no pulmão, sítio da inflamação. Mas, tal ativação parece não ser estendida ao BAL.

Somente o inibidor de Cat G e EN, o rCeEI, foi capaz de diminuir o edema via ativação de PMN, já que somente esses grupos apresentaram atividade de MPO e EN diminuídas em relação ao grupo positivo. Esses resultados validam o modelo, a eficiência desse inibidor e o papel da EN no edema pulmonar. Apesar de haver inibidor endógeno de EN, ele não é capaz de inativar toda a EN liberada no parênquima pulmonar e impedir a formação do edema; portanto, o uso de inibidores exógenos para regular tal atividade se justificaria. Ainda, como, a atividade de Cat G, encontrada no parênquima do pulmão, não é inibida por inibidores endógenos, a busca por inibidores dessa enzima figura como uma estratégia complementar na inibição do processo de desenvolvimento e manutenção do edema. Nesse sentido, experimentos por nós realizados para testar a inibição de EN ou Cat G, purificadas de amostras do homogenato pulmonar, demonstraram a presença de inibidores endógenos para EN; porém, a atividade de Cat G não foi afetada, sugerindo que os inibidores endógenos têm preferência pela EN em relação à Cat G, apesar de inibirem ambas as enzimas

(Korkmaz *et al.*, 2005). Ou seja, a administração de um inibidor exógeno de Cat G poderia contribuir para a inibição do processo de formação do edema, justificando a eficácia do CeKI nesse modelo. Também podemos inferir que EN e Cat G sejam capazes de recrutar PMN para o pulmão; entretanto, somente a inibição de EN é capaz de reverter essa situação, uma vez que é vista a diminuição de atividade de MPO somente nos grupos tratados com rCeEI, e não nos grupos tratados com CeKI. Isso porque a EN é a grande responsável pela maior quantidade de atividade dos PMN. Entretanto, tanto o inibidor de EN e Cat G (rCeEI), como o inibidor de Cat G (CeKI) foram capazes de impedir a formação do edema, visto pela diminuição de PMN no BAL, diminuição de cininas no BAL e no sangue, diminuição das atividades de ECA no BAL e de Cat G no pulmão. Sendo assim, não seria exagero confirmar a importância individual de cada uma das enzimas, EN e Cat G, na formação do edema pulmonar, usando-se o modelo aqui proposto.

Finalmente as atividades de HuPK (dados não mostrados), EN (dados não mostrados), MPO e ECA foram medidas no plasma e no soro dos animais. ECA só foi dosada no soro, pois o EDTA, agente quelante, usado para preservação do sangue em estado fluido, é um inibidor da ECA (metalopectidase). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, quando se analisaram os dados obtidos com HuPK; ou seja, esse parâmetro não é bom marcador para essa doença, apesar de serem usados por alguns pesquisadores (Yamazaki *et al.*, 2000; Hagio *et al.*, 2008). Em relação ao MPO, novamente foi observada uma diminuição dessa atividade quando os animais tratados com rCeEI eram comparados ao controle negativo, o que sugeriria inibição de uma atividade basal. rCeEI, mas não CeKI foi capaz de reverter o aumento de PMN no tecido pulmonar, o que indica uma maior eficácia desse inibidor. No plasma dos animais, também houve diferenças quando se analisaram os dados referentes à presença de cininas; entretanto, poucos trabalhos haviam relacionado esse peptídeo a modelos de edema pulmonar. Dentro desse contexto, Koyama e seus colaboradores vêm contribuindo com muitos estudos, tentando elucidar essa relação *in vitro* (Fujimaki *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 1998a; Koyama *et al.*, 1998); mas ainda nada descreveram sobre modelos *in vivo*. Sendo assim, com esse trabalho pode-se inferir que, em modelos *in vivo*, também há a participação de cininas, mas outros experimentos precisam ser realizados a fim de se determinar o seu real papel e importância nesse modelo.

Há algum tempo, vem sendo sugerida a interrelação das citocinas pró e antiinflamatórias e as peptidases de PMN (Philippe *et al.*, 1992; Tsukada *et al.*, 1994; Bank *et al.*, 1995; Bank; Ansorge, 2001). Também já foi descrito que citocinas e peptidases estão presentes nos sítios inflamatórios, regulando a inflamação, sendo evidenciado que, além do aumento concomitante de citocinas e peptidases de PMN, existam nas citocinas vários possíveis sítios de clivagem para as peptidases, o que sugeriria um *feedback* de regulação (Bank *et al.*, 1995; Bank; Ansorge, 2001). Além disso, a literatura utiliza freqüentemente a liberação de interleucina (IL) pró-inflamatória no BAL como parâmetro para comprovar a inflamação (Asti *et al.*, 2000).

Existe uma concordância temporal entre o aumento de peptidases liberadas por PMN e o aumento nos níveis de IL, em especial de IL-6; além disso, essas enzimas são capazes de degradar a IL-6, inativando-a. No BAL, quando EN e/ou Cat G estão inibidas, a concentração de IL-6 nos grupos tratados com inibidores é igual ao grupo controle positivo e diferente do grupo controle negativo, cuja concentração é mais baixa. No pulmão, acontece o mesmo fenômeno em relação aos grupos controle negativo e controle positivo, mas os animais que foram tratados com rCeEI apresentaram títulos de IL-6 maiores do que os títulos dos outros grupos, mesmo quando comparados ao grupo controle positivo. Isso porque há um *feed beck* negativo entre proteases de neutrófilos e IL, em especial EN e IL-6, como rCeEI é capaz de inibir EN, há um aumento na concentração de IL-6, tal fato não ocorre quando somente a Cat G é inibida (grupos tratados com CeKI). Além disso, esse aumento se mostrou ser dose dependente.



Sabe-se que TNF- α é um bom indicador de indução de edema agudo e como os efeitos no BAL aparecem mais tardiamente, a concentração de TNF- α não foi diferente nesse fluido entre os grupos tratados, exceto para o grupo que recebeu 2,6 mg de CeKI. Quando se analisou o pulmão, o título de TNF- α foi alto nos grupos controle positivo e nos tratados com inibidores; logo, os resultados confirmam que há uma

resposta inflamatória aguda em curso, em resposta à aplicação de LPS e que essa resposta não é revertida pela aplicação de ambos os inibidores. Já que EN cliva preferencialmente em pequenos resíduos hidrofóbicos em P₁, P₂ e P₃ (Korkmaz *et al.*, 2008), existem pelo menos três possíveis sítios de clivagem para EN na seqüência primária de TNF- α ; como ainda não há na literatura relatos sobre modulação de TNF- α por enzimas de PMN, tal relação poderia ser aqui sugerida.

A IL-10 age como citocina antiinflamatória, embora isoladamente não seja um bom indicador de resposta antiinflamatória. Já a razão entre citocinas pró e antiinflamatórias relaciona-se indiretamente à gravidade da doença, sendo a razão de TNF- α /IL-10 uma boa forma de análise (Park *et al.*, 2001). No BAL, apesar de haver uma diminuição dessa razão no grupo controle negativo, a diferença não foi diferente entre os grupos; estando as razões aumentadas nos outros grupos, há indícios de que ainda exista uma reação inflamatória em curso. Além disso, também não há relatos sobre clivagem de IL-10 por enzimas de PMN e não foram encontrados sítios de clivagem para EN. No pulmão, essa diferença é estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, indicando que os níveis de IL-10 estão elevados em relação aos de TNF- α ; sendo assim, constata-se que a resposta nos pulmões ainda é pró-inflamatória, já que essas citocinas estão em maiores concentrações. Todos esses resultados revelam que essa resposta inflamatória é aguda e que não parece ser influenciada pela aplicação de inibidores de EN e ou Cat G. Apesar de ser descrito *in vitro* a interação dessas vias, isso pareceu não ocorrer nesse modelo *in vivo*.

Segundo Lesur e colaboradores (1999), as células alveolares do tipo II são as mais susceptíveis a danos, pois possuem baixa capacidade de regeneração e são as maiores células em relação à área superficial. O papel do epitélio alveolar também já é considerado importante para o desenvolvimento da doença; entretanto, o papel das células alveolares do tipo II ainda não havia sido estudado (Lesur *et al.*, 1999). Nos experimentos *in vitro*, as células epiteliais alveolares do tipo II foram perfeitamente isoladas com o procedimento utilizado; além disso, determinou-se que nos três primeiros dias de cultivo a viabilidade celular era maior e, por isso, os experimentos foram realizados sempre durante esse período. Alguns trabalhos demonstraram que a EN é capaz de agir na célula endotelial, sugerindo que o edema possa ser causado, basicamente, pelo extravasamento de proteína do vaso.

O presente trabalho demonstrou que a EN é capaz de induzir morte celular, provavelmente por apoptose ou anoikis que é um tipo de morte programada, em

células alveolares do tipo II, que são as responsáveis pela produção de surfactante, substância que diminui a tensão superficial, facilitando a troca gasosa. Somando-se esses resultados, é de se esperar que a morte desse tipo de célula contribua para a gravidade da doença, já que além do líquido dificultar a expansão do pulmão, as trocas gasosas também podem estar prejudicadas. Porém, estudos mais abrangentes poderão sugerir a utilização de proteína surfactante no tratamento desse dano na clínica.

Em resumo, esse trabalho amplia o conhecimento de enzimas que participam em patologias pulmonares quando, por exemplo, esse órgão é acometido por bactérias, uma das etiologias do edema. Além disso, demonstra que a Cat G pode apresentar um papel mais significativo do que era proposto antigamente na formação do edema e que pode agir de forma diferente da EN. Tal conhecimento contribuiria para o desenvolvimento de drogas mais específicas e eficazes, já que a inibição da Cat G provoca uma redução no edema, sem necessariamente haver uma diminuição da resposta imune do hospedeiro. Em relação à EN, essa peptidase ainda permanece como grande responsável pela resposta imune dos PMN, principalmente em modelo de edema pulmonar. Há indícios de que sua regulação, feita por inibidores exógenos, possa ter aplicação clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Thoracic Society. (1990). Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am. Rev. Resp. Dis.* 142: 481-486
- Andreotti R., Gomes A., Malavazi-Piza K.C., Sasaki S.D., Sampaio C.A., Tanaka A.S. (2002). BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int Immunopharmacol.* 2 (4): 557-63.
- Antcheva N., Patthy A., Athanasiadis A., Tchorbanov B., Zakhariiev S., Pongor S. (1996). Primary structure and specificity of a serine proteinase inhibitor from paprika (*Capsicum annuum*) seeds. *Biochim. Biophys. Acta* 1298: 95-101.
- Araujo M.S., Andreotti R., Tiaen M., Nunes V., Oliva M.L., Sampaio M., Imura O., Shimamoto K., Ura N., Sampaio C. (1996). *Caiman crocodilus* yacare plasma kininogen detection. *Immunopharmacology*; 32 (1-3): 82-4.
- Araujo M.S., Cruz-Silva I. (2008). "Pau-brasil, da semente à madeira: conhecer para preservar." Instituto de Botânica/Secretaria do Meio Ambiente.
- Arndt P.G., Young S.K., Poch K.R., Nick J.A., Falk S., Schrier R.W., Worthen G.S. (2006). Systemic inhibition of the angiotensin-converting enzyme limits lipopolysaccharide-induced lung neutrophil recruitment through both bradykinin and angiotensin II-regulated pathways. *J. Immunol.* 177 (10): 7233-7241.
- Asti C., Ruggieri V., Porzio S., Chiusaroli R., Melillo G., Caselli G.F. (2000). Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage. *Pulm Pharmacol Ther.* 13(2): 61-9.
- Bank U., Ansorge S. (2001). More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J. Leukoc. Biol.* 69 (2): 197-206.
- Bank U., Küpper B., Reinhold D., Hoffmann T., Ansorge S. (1999). Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Lett.* 461 (3): 235-240.
- Bank, U., Reinhold, D., Kunz, D., Schulz, H.U., Schneemilch, C., Brandt, W., Ansorge, S. (1995) Effects of interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor-beta (TGF-beta) on neutrophil elastase release. *Inflammation* 19, 83–99.
- Barnes P.J. (1992). Effect of bradykinin on airway function. *Agents Actions Suppl.* 38 (Pt 3):432-8.

- Batista I.F.C., Oliva M.L.V., Araujo M.S., Sampaio M.U., Richardson M., Fritz H., Sampaio C.A.M. (1996). Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry*, 41 (4): 1017-22.
- Bhatia M., Moochhala S. (2004). Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* 202(2): 145-156.
- Bieth J.G. (1986). In: Mecham RP Regulation of Matrix Accumulation. New York: Academic Press. p. 217.
- Blackwell J.R., Horgan R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* 295 (1-3): 10-2.
- Bode W., Huber R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204: 433-451.
- Bode W., Meyer E.Jr., Powers J.C. (1989). Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 7; 28 (5): 1951-63.
- Bode W., Wei A.Z., Huber R., Meyer E., Travis J., Neumann S. (1986). X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor. *EMBO J.* 5 (10): 2453-8.
- Borer J.S. (2004). Drug insight: If inhibitors as specific heart-rate-reducing agents. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 1 (2): 103-9.
- Borriello F., Krauter K.S. (1990). Reactive site polymorphism in the murine protease inhibitor gene family is delineated using a modification of the PCR reaction (PCR + 1). *Nucleic Acids Res.* 18 (18): 5481-7.
- Botes D.P., Qobose M.D., Corfield V.A. (1991). Synthesis of a wild-type and three mutant *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-encoding genes by a single-strand approach. *Gene* 105 (2): 243-7.
- Boulter D. (1993). Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry* 34 (6): 1453-66.
- Boutten A., Venembre P., Seta N., Hamelin J., Aubier M., Durand G., Dehoux M.S. (1998). Oncostatin M is a potent stimulator of alpha1-antitrypsin secretion in lung epithelial cells: modulation by transforming growth factor-beta and interferon-gamma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18 (4): 511-520.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7; 72: 248-54.

- Bryant J.W., Shariat-Madar Z. (2009). Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* (3): 234-250.
- Butenas S., van 't Veer C., Cawthorn K., Brummel K.E., Mann K.G. (2000). Models of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 11 Suppl 1: S9-13.
- Campbell, E.J., Silverman, E.K., Campbell, M.A. (1989) Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. *J. Immunol.* 143, 2961–2968
- Cardoso M.A., Provan J., Powell W., Ferreira P.C.G., De Oliveira D.E. (1998). High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Mol. Ecol.* 7, 601-8.
- Chen H.B., Weng J.M., Jiang K., Bao J.S. (1990). A new method for the synthesis of a structural gene. *Nucleic Acids Res.* 18 (4): 871-8.
- Christeller J.T. (2005). Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J.* 272 (22): 5710-5722.
- Coeshott C., Ohnemus C., Pilyavskaya A., Ross S., Wieczorek M., Kroona H., Leimer A.H., Cheronis J. (1999). Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (11): 6261-6266.
- Cotran R.S, Kumar V., Collins T. (1999). O pulmão. In: Robbins pathologic basis of disease. Rio de Janeiro: Editora Guanabara. p. 628-30.
- Cregg J.M., Vedvick T.S., Raschke W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (NY)*. (8): 905-910.
- Creighton T.E., Darby N.J. (1989). Functional evolutionary divergence of proteolytic enzymes and their inhibitors. *Trends Biochem Sci.* 14 (8): 319-25.
- Cruz-Silva I., Gozzo A.J., Nunes V.A., Carmona A.K., Faljoni-Alario A., Oliva M.L., Sampaio M.U., Sampaio C.A., Araujo M.S. (2004). A proteinase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIIa. *Biol Chem.* 385 (11): 1083-6.
- Cruz-Silva I., Gozzo A.J., Nunes V.A., Watanabe R.M.O., Tanaka A.S., Hirata I.Y., Carmona A.K.; Oliva M.L.V., Lopes-Ferreira M., Neuhof C., Neuhof H., Sampaio, M.U., Araujo M.S. (2005). Protease inhibitors from *Caesalpinia echinata* (pau-

- brasil) seeds. In: 4th General Meeting of the International Proteolysis Society associated with the International Conference on Protease Inhibitors, Quebec, Canadá. Abstract Book, 2005. vol. 1. p. 214-214.
- Cruz-Silva I., Neuhof C., Gozzo A.J., Nunes V.A., Hirata I.Y., Figueiredo-Ribeiro R.C., Almeida Tavares F.C., Neuhof H., Sampaio M.U., Araujo M.S. (2010). *Caesalpinia echinata* inhibitors as tools to study the involvement of human neutrophil elastase and cathepsin G on pulmonary edema. Submetido ao Phytomedicin.
- Davis, W.B., Fells, G.A., Sun, X.H., Gadek, J.E., Venet, A., Crystal, R.G. (1984) Eosinophil-mediated injury to lung parenchymal cells and interstitial matrix. A possible role for eosinophils in chronic inflammatory disorders of the lower respiratory tract. J. Clin. Invest. 74, 269–278.
- DeClerck Y.A., Imren S. (1994). Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. Eur J Cancer 30A (14): 2170-80.
- Derman A.I., Prinz W.A., Belin D., Beckwith J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Science. 262 (5140):1744-1747.
- Doyle J.J., Luckow M.A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiol. 131 (3): 900-10.
- Dubendorff J.W., Studier F.W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. J. Mol. Biol. 219 (1): 45-59.
- Duong M., Simard M., Bergeron Y., Bergeron M.G. (2001). Kinetic study of the inflammatory response in *Streptococcus pneumoniae* experimental pneumonia treated with the ketolide HMR 3004. Antimicrob Agents Chemother. 45(1):252-62.
- Edman P. (1956). On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. Acta Chem Scand.; 10: 761-768.
- Ehrhart I.C., Zou L., Theodorakis M.J., Parkerson J.B., Gu X., Caldwell R.B., Catravas J.D. (2000). Effect of nitrite on endothelial function in isolated lung. Gen Pharmacol. 34 (6): 401-408.

- European Society of Pneumology Task Group on BAL: (1989). Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur. Resp. J.* 2:561-585.
- Fodor K., Harmat V., Hetényi C., Kardos J., Antal J., Perczel A., Patthy A., Katona G., Gráf L. (2005). Extended intermolecular interactions in a serine protease-canonical inhibitor complex account for strong and highly specific inhibition. *J. Mol. Biol.* 350(1): 156-169.
- Frokiaer H., Horlyck L., Sorensen S., Sorensen H. (1994). Immunoaffinity chromatography purification and characterization of pea trypsin inhibitors. *J Sci Food Agric.* 66: 61-9.
- Fujimaki H., Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Hojo R., Sato F., Kunugita N., Arashidani K. (2007). Effect of long-term exposure to low-level toluene on airway inflammatory response in mice. *Toxicol Lett.* 168(2):132-9.
- Futami J., Tsushima Y., Tada H., Seno M., Yamada H. (2000). Convenient and efficient *in vitro* folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies. *J Biochem;* 127 (3): 435-441.
- Gatti G., Bonomi I., Jannuzzi G., Perucca E. (2000). The new antiepileptic drugs: pharmacological and clinical aspects. *Curr Pharm Des.* 6 (8): 839-60.
- Golino P., Forte L., De Rosa S. (2004). Inhibition of the tissue factor coagulation pathway. *Curr Vasc Pharmacol.* 2 (4): 319-27.
- Greenblatt H.M., Ryan C.A., James M.N. (1989). Structure of the complex of *Streptomyces griseus* proteinase B and polypeptide chymotrypsin inhibitor-1 from Russet Burbank potato tubers at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol.* 205 (1): 201-28.
- Groeneveld A.B. (2002). Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascul Pharmacol.* 2; 39 (4-5): 247-56.
- Hagio T., Kishikawa K., Kawabata K., Tasaka S., Hashimoto S., Hasegawa N., Ishizaka A. (2008). Inhibition of neutrophil elastase reduces lung injury and bacterial count in hamsters. *Pulm Pharmacol Ther.* 21 (6): 884-91.
- Hagio T., Nakao S., Matauoka H., Kawabata K., Ohno H. (2001). Inhibition of neutrophil elastase activity attenuates complement-mediated lung injury in the hamster. *Eur J Pharmacol.* 426: 131–8.
- Hammond R.W., Foard D.E., Larkins B.A. (1984). Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. *J Biol Chem.;* 259 (15): 9883-9990.

- Hara S., Makino J., Ikenaka T. (1989). Amino acid sequences and disulfide bridges of serine proteinase inhibitors from bitter melon (*Momordica charantia* LINN.) seeds. *J Biochem.*; 105 (1): 88-91.
- Havemann K., Gramse M. (1984). Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes. *Adv Exp Med Biol.* 167: 1–20.
- Hayashi K., Takehisa T., Hamato N., Takano R., Hara S., Miyata T., Kato H. (1994). Inhibition of serine proteases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. *J. Biochem.* 116 (5): 1013-1018.
- Henriksen P.A., Sallénave J.M. (2008). Human neutrophil elastase: Mediator and therapeutic target in atherosclerosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (6-7): 1095-100.
- Hiemstra P.S. (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2): 116-120.
- Hiemstra P.S. (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem Soc Trans.* 30 (2): 116-20.
- Idell S., Kucich U., Fein A., Kueppers F., James H.L., Walsh P.N., Weinbaum G., Colman R.W., Cohen A.B. (1985). Neutrophil elastase-releasing factors in bronchoalveolar lavage from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am. Ver. Respir. Dis.* 132(5): 1098-10105.
- Imai Y., Kuba K., Penninger J.M. (2008). The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. *Exp Physiol.* 93(5):543-8.
- Janoff A. (1985). Elastase in tissue injury. *Annu Rev Med.* 36: 207-16.
- Jansson A.H., Eriksson C., Wang X. (2005). Effects of budesonide and N-acetylcysteine on acute lung hyperinflation, inflammation and injury in rats. *Vascul Pharmacol.* 43 (2):101-11.
- Jonakova V., Calvete J.J., Mann K., Schafer W., Schmid E.R., Topfer-Petersen E. (1992). The complete primary structure of three isoforms of a boar sperm-associated acrosin inhibitor. *FEBS Lett.*; 297 (1-2): 147-150.
- Kargi, H. A., Campbell, E. J., Kuhn, C., III (1990) Elastase and cathepsin G of human monocytes. Heterogeneity and subcellular localization to peroxidase-positive granules. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1179–1186.
- Kawabata K., Hagio T., Matsumoto S., Nakao S., Orita S., Aze Y., Ohno H. (2000). Delayed neutrophil elastase inhibition prevents subsequent progression of

- acute lung injury induced by endotoxin inhalation in hamsters. *Am J Respir Crit Care Med.* 161 (6): 2013-8.
- Kawabata K., Hagio T., Matsuoka S. (2002). The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur J Pharmacol.* 451 (1): 1-10.
- Kennedy A.R. (1998). The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr.* 68 (6 Suppl): 1406-12.
- Kim J.Q., Song J., Park Y.B., Hong S.H. (1998). Molecular bases of coronary heart disease in Koreans. *J Korean Med Sci.* 13 (1): 1-15.
- Kips J.C., Joos G.F., Peleman R.A., Pauwels R.A. (1993). The effect of zardaverine, an inhibitor of phosphodiesterase isoenzymes III and IV, on endotoxin-induced airway changes in rats. *Clin Exp Allergy* 23 (6): 518-23.
- Kishima H., Takeda S., Miyoshi S., Matsumura A., Minami M., Utsumi T., Omori K., Nakahara K., Matsuda H. (1998). Microvascular permeability of the non-heart-beating rabbit lung after warm ischemia and reperfusion: role of neutrophil elastase. *Ann. Thorac. Surg.* 65 (4): 913-8.
- Korkmaz B., Moreau T., Gauthier F. (2008). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 90 (2): 227-42.
- Korkmaz B., Poutrain P., Hazouard E., de Monte M., Attucci S., Gauthier F.L. (2005). Competition between elastase and related proteases from human neutrophil for binding to alpha1-protease inhibitor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 (6): 553-559.
- Kouzuma Y., Yamasaki N., Kimura M. (1997). Cloning, expression, and mutagenesis of trypsin inhibitor ETIb from *Erythrina variegata* seeds. *Biosci Biotechnol Biochem.*; 61 (6): 1041-1043.
- Koyama S., Sato E., Masubuchi T., Takamizawa A., Kubo K., Nagai S., Izumi T. (1998a). Alveolar type II-like cells release G-CSF as neutrophil chemotactic activity. *Am J Physiol.* 275(4 Pt 1):L687-93.
- Koyama S., Sato E., Nomura H., Kubo K., Miura M., Yamashita T., Nagai S., Izumi T. (1998). Bradykinin stimulates type II alveolar cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity and inflammatory cytokines. *Am J Pathol.* 153 (6): 1885-93.

- Koyama S., Sato E., Numanami H., Kubo K., Nagai S., Izumi T. (2000). Bradykinin stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22 (1): 75-84.
- Krowarsch D., Cierpicki T., Jelen F., Otlewski J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 2427-2444.
- Kuramitsu J., Iwanaga S., Yamasaki N., Kimura M. (1996). Molecular cloning of cDNA that encodes chymotrypsin inhibitor ECI from *Erythrina variegata* seeds and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.*; 60 (9): 1469-1473.
- Kurata M., Horii I. (2004). Blood coagulation tests in toxicological studies--review of methods and their significance for drug safety assessment. *J Toxicol Sci.* 29 (1): 13-32.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227 (259): 680-5.
- Lambert D.W., Clarke N.E., Turner A.J. (2010). Not just angiotensinases: new roles for the angiotensin-converting enzymes. *Cell Mol. Life Sci.* 67 (1): 89-98.
- Laouar A., Villiers C., Sancéau J., Maison C., Colomb M., Wietzerbin J., Bauvois B. (1993). Inactivation of interleukin-6 in vitro by monoblastic U937 cell plasma membranes involves both protease and peptidyl-transferase activities. *Eur. J. Biochem.* 215(3): 825-831.
- Laskowski M. Jr., Kato I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* 49: 593-626.
- Lawrence P.K., Koundal K.R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *J. Biotechnol.* 5. 93–109.
- Lestienne P., Bieth J.G. (1980). Activation of human leukocyte elastase activity by excess substrate, hydrophobic solvents, and ionic strength. *J Biol Chem.* 10; 255 (19): 9289-94.
- Lesur O., Berthiaume Y., Blaise G., Damas P., Deland E., Guimond J.G., Michel R.P. (1999). Acute respiratory distress syndrome: 30 years later. *Can. Respir. J.* 6 (1): 71-86.
- Liau T.G., Campbell E.J. (1995). Nonisotropic enzyme–inhibitor interactions: a novel mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry* 34: 16171–7.
- Licker M., Morel D.R. (1998). Inhibitors of the renin angiotensin system: implications for the anaesthesiologist. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 11 (3): 321-326.

- Lopes-Ferreira M., Emim J.A., Oliveira V., Puzer L., Cezari M.H., Araujo M.S., Juliano L., Lapa A.J., Souccar C., Moura-da-Silva A.M. (2004). Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochem Pharmacol.*; 68 (11): 2151-7.
- Lungarella G., Cavarra E., Lucattelli M., Martorana P.A. (2008). The dual role of neutrophil elastase in lung destruction and repair. *Int J Biochem Cell Biol.* 40 (6-7): 1287-96.
- Maeda H., Wu J., Okamoto T., Maruo K., Akaike T. (1999). Kallikrein-kinin in infection and cancer. *Immunopharmacology* 43 (2-3): 115-128.
- Malavazi-Piza K.C., Araujo M.S., Godinho R.O., Tanaka A.S. (2004). Effect of invertebrate serine proteinase inhibitors on carrageenan-induced pleural exudation and bradykinin release. *Int Immunopharmacol.* 4 (10-11): 1401-8.
- Marshall P., Heudi O., McKeown S., Amour A., Abou-Shakra F. (2002). Study of bradykinin metabolism in human and rat plasma by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16(3): 220-228.
- Marshall R.P., Gohlke P., Chambers R.C., Howell D.C., Bottoms S.E., Unger T., McAnulty R.J., Laurent G.J. (2004). Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286 (1): L156-64.
- McGuire M.J., Lipsky P.E., Thiele D.L. (1993). Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I, *J. Biol. Chem.* 268: 2458-2467.
- McPhalen C.A., James M.N. (1987). Crystal and molecular structure of the serine proteinase inhibitor CI-2 from barley seeds. *Biochemistry* 26 (1): 261-9.
- Mello G.C., Desouza I.A., Marangoni S., Novello J.C., Antunes E., Macedo M.L. (2006). Oedematogenic activity induced by Kunitz-type inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds. *Toxicon* 47 (2): 150-5.
- Moreau T., Baranger K., Dadé S., Dallet-Choisy S., Guyot N., Zani M.L. (2008). Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie*; 90 (2): 284-295.
- Morrison H.M., Welgus H.G., Stockley R.A., Burnett D., Campbell E.J. (1990). Inhibition of human leukocyte elastase bound to elastin: relative ineffectiveness and two mechanisms of inhibitory activity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2: 263–9.

- Morrison J.F. (1982). The slow binding and slow tight-binding inhibition of enzyme-catalyzed reactions. TIBS; p.102-105.
- Murooka Y., Ikeda R. (1989). Biosynthesis and secretion of pullulanase, a lipoprotein from *Klebsiella aerogenes*. J Biol Chem. 264 (29): 17524-31.
- Nakajima K., Powers J.C., Ashe B.M., Zimmerman M. (1979). Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site. J Biol Chem.; 254 (10): 4027-4032.
- Nesheim M. (2003). Thrombin and fibrinolysis. Chest 124: 33S-9S.
- Neuhof C., Oliva M.L., Maybauer D., Maybauer M., de Oliveira C., Sampaio M.U., Sampaio C.A., Neuhof H. (2003). Effect of plant Kunitz inhibitors from *Bauhinia bauhinoides* and *Bauhinia rufa* on pulmonary edema caused by activated neutrophils. Biol Chem. 384 (6): 939-44.
- Neuhof H., Hoffmann C., Seeger W., Suttrop N., Fritz H. (1989). Proteases as mediators of pulmonary vascular permeability. Prog Clin Biol Res. 308: 305-14.
- Nishina K., Mikawa K., Takao Y., Maekawa N., Shiga M., Obara H. (1997). ONO-5046, an elastase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. Anesth Analg. 84 (5): 1097-103.
- Okada Y., Watanabe S., Nakanishi I., Kishi J., Hayakawa T., Watorek W., Travis J., Nagase H. (1988). Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. FEBS Lett. 229 (1): 157-60.
- Oliva M.L.V., Souza-Pinto J.C., Batista I.F.C., Araujo M.S., Silveira V.F., Auerswald E.A., Mentele R., Eckerskorn C., Sampaio U.M., Sampaio C.A.M. (2000). *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. Biochim Biophys Acta 1477 (1-2): 64-74.
- Oliveira L.G., Gozzo A.J., Nunes V.A., Silva I.C., Sampaio M.U., Sampaio C.A.M., Araujo M.S. (2002). Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) - isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. Revista Brasileira de Farmacognosia 12: 72-4.
- Otlewski J., Jelen F., Zakrzewska M., Oleksy A. (2005). The many faces of protease-protein inhibitor interaction. EMBO J. ;24: 1303-1310.
- Owen C.A., Campbell E.J. (1999). The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. J. Leukoc. Biol. 65 (2): 137-50.

- Owen C.A., Campbell M.A., Sannes P.L., Boukedes S.S., Campbell E.J. (1995). 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.* 131: 775–89.
- Oyama H., Abe S., Ushiyama S., Takahashi S., Oda K. (1999). Identification of catalytic residues of pepstatin-insensitive carboxyl proteinases from prokaryotes by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 274 (39): 27815-22.
- Park W.Y., Goodman R.B., Steinberg K.P., Ruzinski J.T., Radella F. 2nd, Park D.R., Pugin J., Skerrett S.J., Hudson L.D., Martin T.R. (2001). Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (10 Pt 1): 1896-1903.
- Peterson M.W., Walter M.E., Nygaard S.D. (1995). Effect of neutrophil mediators on epithelial permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 13: 719–27.
- Philippe, J., Dooijewaard, G., Offner, F., Turion, P., Baele, G., Leroux-Roels, G. (1992) Granulocyte elastase, tumor necrosis factor-alpha and urokinase levels as prognostic markers in severe infection. *Thromb. Haemost.* 68, 19–23.
- Planchais S., Glab N., Inze D., Bergounioux C. (2000). Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett.* 476 (1-2): 78-83.
- Plotnick M.I., Schechter N.M., Wang Z.M., Liu X., Rubin H. (1997). Role of the P6-P3' region of the serpin reactive loop in the formation and breakdown of the inhibitory complex. *Biochemistry*, 36 (47): 14601-8.
- Polli L.S.; Cruz-Silva I.; Montanaro S.; Gonzáles-Gonzáles Y.; Alves K.B.; Araujo M.S. "Purification and characterization of one aminopeptidase from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds." In: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia. XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), XI Congress of the PABMB, 2008.
- Powers J.C., Asgian J.L., Ekici O.D., James K.E. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev.* 102 (12): 4639-750.
- Praxedes-Gracia P. (2008) "Purificação e caracterização de uma peptidase de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Estudo da relação da atividade enzimática com a viabilidade das sementes durante a armazenagem." Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

- Price G.C., Thompson S.A., Kam P.C. (2004). Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia* 59 (5): 483-92.
- Raats C.J., Van Den Born J., Berden J.H. (2000). Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int.* 57: 385–400.
- Rao D.N., Page M.G., Bickle T.A. (1989). Cloning, over-expression and the catalytic properties of the EcoP15 modification methylase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 209 (4): 599-606.
- Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378: 705-716.
- Rheume C., Goodwin R.L., Latimer J.J., Baumann H., Berger F.G. (1994). Evolution of murine alpha 1-proteinase inhibitors: gene amplification and reactive center divergence. *J Mol Evol.* 38 (2): 121-31.
- Richardson M. (1977). The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*; 16: 159-169.
- Richardson M. (1991). Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In *Methods in Plant Biochemistry*. New York, Academic Press. 5: 259-305.
- Rocha Y.T. (2004). Ibirapitinga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil do descobrimento à atualidade. Tese de Doutorado do Departamento de Geografia da Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo.
- Rokosz L.L., Boulton D.A., Butkiewicz E.A., Sanyal G., Cueto M.A., Lachance P.A., Hermes J.D. (1994). Human cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase: expression, purification, and characterization of recombinant wild-type and Cys129 mutant enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 312 (1):1-13.
- Ryan C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathol.* 28: 425-49.
- Ryan U.S., Ryan J.W., Chiu A. (1976). Kininase II (angiotensin converting enzyme) and endothelial cells in culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* 70: 217-227.
- Safianowska A., Grubek-Jaworska H., Droszcz P., Rybus L., Dabrowski A., Zwolska Z., Matysiak W., Chazan R. (2001). Levels of CEA, antibodies against mycobacterial antigens and ACE activity in serum and in BALF in patients with sarcoidosis, tuberculosis and lung cancer--preliminary results. *Pneumonol Alergol Pol.* 69 (1-2): 5-13.

- Salvesen G., Farley D., Shuman J., Przybyla A., Reilly C., Travis J. (1987). Molecular cloning of human cathepsin G: structural similarity to mast cell and cytotoxic T lymphocyte proteinases. *Biochem.* 26: 2289-2293
- Sampaio C.A.M., Motta G., Sampaio M.U., Oliva M.L.V., Araújo M.S., Stella R.C.R., Tanaka A.S., Batista I.F.C. (1992). Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of the kallikrein kinin system. *Agents and Actions* 36: 191-9
- Sato E., Nelson D.K., Koyama S., Hoyt J.C., Robbins R.A. (2000). Bradykinin stimulates eotaxin production by a human lung fibroblast cell line. *J Allergy Clin Immunol.* 106 (1 Pt 1): 117-23.
- Schechter I., Berger A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 20; 27 (2): 157-62.
- Schuler T.H., Poppy G.M., Kerry B.R., Deuholm I. (1998). Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 16: 168-175.
- Segel I.H. (1993) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, Wiley-Interscience, New York.
- Shimada M., Tsukada H., Ishizuka O., Kon Y., Hasegawa T., Suzuki E., Gejyo F. (2000). Lipopolysaccharide tolerance in relation to intrabronchial influx of neutrophils in the rat. *Lung* 178 (4): 235-48.
- Shimamoto K., Miura T., Miki T., Iimura O. (1992). Activation of kinins on myocardial ischemia. *Agents Actions Suppl.* 38: 90-97.
- Shin H., Renatus M., Eckelman B.P., Nunes V.A., Sampaio C.A., Salvesen G.S. (2005). The BIR domain of IAP-like protein 2 is conformationally unstable: implications for caspase inhibition. *Biochem J.* 385 (Pt 1): 1-10.
- Sinha S., Watorek W., Karr S., Giles J., Bode W., Travis J. (1987). Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84 (8): 2228-32.
- Specks U., Martin W.J. 2nd, Rohrbach M.S. (1990). Bronchoalveolar lavage fluid angiotensin-converting enzyme in interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis.* 141 (1): 117-23.
- Steimer A., Laue M., Franke H., Haltner-Ukomado E., Lehr C.M. (2006). Porcine alveolar epithelial cells in primary culture: morphological, bioelectrical and immunocytochemical characterization. *Pharm Res.* 23 (9): 2078-93.
- Strop P., Cechova D., Wuthrich K. (1983). Preliminary structural comparison of the proteinase iso-inhibitors IIA and IIB from bull seminal plasma based on individual

- assignments of the ¹H nuclear magnetic resonance spectra by two-dimensional nuclear magnetic resonance at 500 MHz. *J Mol Biol.*; 166 (4): 669-676.
- Taylor C., Ford K., Connolly B.A., Hornby D.P. (1993). Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. *Biochem J.* 291 (Pt 2): 493-504.
- Travis J., Salvesen G.S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *Ann Rev Biochem.* 52: 655–709.
- Tsukada, K., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. (1994) Peritoneal interleukin-6, interleukin-8 and granulocyte elastase activity after elective abdominal surgery. *APMIS* 102, 837–840.
- Turecek P.L., Varadi K., Gritsch H., Schwarz H.P. (2004). FEIBA: mode of action. *Haemophilia* 10 Suppl 2: 3-9.
- Turner R.B., Liu L., Sazonova I.Y., Reed G.L. (2002). Structural elements that govern the substrate specificity of the clot-dissolving enzyme plasmin. *J Biol Chem.* 277 (36): 33068-74.
- Vachon E., Bourbonnais Y., Bingle C.D., Rowe S.J., Janelle M.F., Tremblay G.M. (2002). Anti-inflammatory effect of pre-elafin in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Biol Chem.* 383(7-8):1249-56.
- Vaday G.G., Líder O. (2000). Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol.* 67 (2): 149-59
- Valueva T.A., Mosolov V.V. (1999). Proteins inhibitors of proteinases in seeds; I. Classification, distribution, structure and properties. *Russ. J. Plant Physiol.* 46: 307-21.
- van der Veen B.S., de Winther M.P., Heeringa P. (2009). Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal*;11 (11): 2899-937.
- Vodkin L.O., Scandalios J.G. (1981). Genetic control, developmental expression, and biochemical properties of plant peptidases. *Isozymes Curr Top Biol Med Res.*; 5:1-25.
- Weiss S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 320 (6): 365–76.
- Werb Z., Banda M.J., McKerrow J.H., Sandhaus R.A. (1982). Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol.* 79 Suppl 1:154-9.

- Wiener-Kronish J.P., Gropper M.A., Matthay M.A. (1990). The adult respiratory distress syndrome: definition and prognosis, pathogenesis and treatment. *Br J Anaesth.* 65: 107–29.
- Williams S.E., Brown T.I., Roghanian A., Sallenave J.M. (2006). SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clinical Science*; 110, 21–35.
- Yamazaki T., Ooshima H., Usui A., Watanabe T., Yasuura K. (1999). Protective effects of ONO-5046*Na, a specific neutrophil elastase inhibitor, on postperfusion lung injury. *Ann Thorac Surg.* 68 (6): 2141-6.
- Yamazaki Y., Kubo K., Fujimoto K., Matsuzawa Y., Sekiguchi M., Honda T. (2000). Pulmonary function tests of *Mycobacterium avium-intracellulare* infection: correlation with bronchoalveolar lavage fluid findings. *Respiration* 67 (1): 46-51.

ABSTRACT

Neutrophil elastase (NE) and cathepsin G (Cat G) are important peptidases involved in the defense against microorganisms and their activities are strictly controlled by endogenous inhibitors. However, in some diseases, as pulmonary edema, there is a misbalance between these enzymes and their inhibitors. It is already known that pulmonary edema treatment with NE inhibitors can diminish the severity of this disease, but little is known about Cat G inhibitors. As the available commercial inhibitors present many collateral effects or low efficiency, the search for new inhibitors is justified. Our laboratory has already purified, characterized, cloned and expressed peptidase inhibitors from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds, as a human plasma kallikrein inhibitor (CeKI), which also inhibits Cat G and an EN and Cat G inhibitor (CeEI). It would be interesting to explore the action of these inhibitors for a better understand of each enzyme contribution on the pulmonary edema physiopathology. So the aim of this work was to express, purify and characterize a recombinant *C. echinata* elastase inhibitor (rCeEI), determinate the smallest active peptide, and also verify the effect of these inhibitors in an *in vivo* pulmonary edema model and the role of NE in a culture of alveolar epithelial type II cells. After cloning the cDNA (700 pb) fragment, two sequences with the same reactive site but some different amino acids residues (rCeEI-4 e rCeEI-5) were isolated and their specificities were tested. According the kinetics studies the NE inhibition by CeEI is a mix type, but they showed different dissociation constants for Cat G. In order to obtain the smallest active peptide, primers were designed and the DNA fragment was inserted into the plasmid for expression in bacteria (*E. coli* stain BL21Si) or yeast (*Pichia pastoris*). Although both proteins inhibited the same enzymes, they showed different affinities for Cat G and chymotrypsin. The smallest active peptide was obtained by the CeEI reactive site in their tertiary structure. Three possible active fragments were delimited; two of them were produced by Molecular Biology and one was synthesized. The smallest active peptide is the whole protein which is stable and maintains its activity. For *in vivo* studies, Wistar rats received Cat G inhibitor (CeKI), or Cat G and NE inhibitor rCeEI in their tail. In sequence, animals received 75 µg lipopolysaccharide in their tracheas, and after six hours they were killed, blood was collected, bronchoalveolar fluid was performed (BALF) and lungs were processed. In this *in vivo* model, some alterations have been observed in the animals treated with the two inhibitors: in the BALF, decreased the numbers of polymorphonuclear leukocyte cells, the angiotensin converting enzyme activity and the

presence of kinin; in the blood, kinin releasing was diminished; in the lung, the Cat G activity was decreased, however, they were observed lower NE and myeloperoxidase activities only when animals were treated with NE and Cat G inhibitor (rCeEI). Also, only animals treated with rCeEI had an increasing in interleukin 6 concentrations. These results show that both inhibitors are able to diminish the pulmonary inflammatory process, although rCeEI was more effective. It was primary culture of epithelial alveolar cells type II from lungs of neonate Wistar rats and the identification of these cells was performed with antibody anti surfactant associated to protein C. NE can induce cells death by apoptosis, which could aggravate the lung injury.

**Publicações feitas durante a elaboração da tese de doutorado
(maio de 2006 a junho de 2010):**

A. Artigos publicados

1. Gozzo, A.J.; Nunes, V.A.; **Cruz-Silva I.**; Nader, H.B.; Sampaio, M.U.; Araujo, M.S. Heparin modulation of human plasma kallikrein on different substrates and inhibitors. *Biological Chemistry*, v. 387, p. 1129-1138, 2006.
2. Iores-Marçal, L.M.; Buck, H.S.; Viel, T.A.; Nunes, V. A.; Gozzo, A.J.; **Cruz-Silva I.**; Miranda, A.; Shimamoto, K.; Ura N.; Araujo, M.S. Bradykinin release and inactivation in brain of rats submitted to an experimental model of Alzheimer's disease. *Peptides (New York)*, v. 27, p. 3363-3369, 2006.

B. Artigos submetidos à publicação

1. **Cruz-Silva I.**; Neuhof C., Gozzo A.J., Nunes V.A., Hirata I.Y., Figueiredo-Ribeiro R.C., Tavares F.C.A., Neuhof H., Sampaio M.U., Araujo M.S. *Caesalpinia echinata* inhibitors as tools to study the involvement of human neutrophil elastase and cathepsin G on pulmonary edema. Submetido ao *Phytomedicin* em 2010.
2. Gozzo A.J., Motta G., **Cruz-Silva I.**, Nunes V.A., Barros N.M.T., Carmona A.K., Sampaio M.U., Michelacci Y.M.C., Nader H.B., Araújo M.S. Assembly of kininogen on endothelial cells is affected by glycosaminoglycans. Submetido ao *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* em 2010.
3. Oliveira-Santos J., Nunes V.A., **Cruz-Silva I.**, Praxedes-Garcia P., Gozzo A.J., Rydlewski M.D., González-González Y., Michelacci Y.M.C., Nader H.B., Araújo M.S. Glycosaminoglycans modify elastase action in vitro and enhance elastase-induced cell death in cultured fibroblasts. Submetido ao *Journal of Biomedicin and Biotechnology* em 2010.

C. Artigo escrito

Cruz-Silva I., Praxedes-Garcia P., Gozzo A.J., Nunes V.A., Lima C.A., Nakaie C.R., Tanaka A.S., Araujo M.S. Molecular cloning, expression, characterization and kinetic studies of inhibitors from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds.

D. Capítulo de livro

Araujo, M.S.; **Cruz-Silva I.** Compostos Bioativos em Sementes de Pau-Brasil. In: Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro; Claudio José Barbedo; Edenise Segala Alves; Marisa Domingos; Márcia Regina Braga. (Org.). Pau-Brasil das sementes à madeira. São Paulo: 2008, p. 51-56.

E. Participação em congressos nacionais e internacionais

1. XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Serine Proteases Inhibitors as Tool for Lung Edema Study. 2010.
2. XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Effect of a kallikrein inhibitor in an in vivo lung edema model. 2009.
3. XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB. Cloning, expression and purification of a fragment of the human neutrophil elastase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds. 2008.
4. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 10th IUBMB Conference. New in vitro and in vivo studies of a human plasma kallikrein inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds. 2007.
5. 5th General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS 2007). Cloning, purification and characterization of proteins present on *Caesalpinia echinata* seeds. 2007.
6. XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Cloning, purification and characterization of proteins present on *Caesalpinia echinata* seeds. 2006.

F. Prêmio internacional

TRAVEL AWARDS International Proteolysis Society, 2007. General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS 2007).

G. Coorientação de monografia de final de curso

Coorientação da monografia “Ação do inibidor de elastase extraído das sementes de *Caesalpinia echinata* em um modelo de psoríase”, apresentada pela aluna Mariana Rydlewski Domingos, para obtenção da graduação no curso de Biomedicina na Universidade Federal de São Paulo, em 2009, com Bolsa da FAPESP desde 2007.

H. Coorientação de iniciações científicas

Nayara Soares Nogueira, aluna da Tecnologia Oftálmica da Universidade Federal de São Paulo, 2010 – Ação da elastase de neutrófilo humano em cultura de células pulmonares do tipo II, com bolsa do CNPq a partir de agosto de 2009.