

Rosemeire da Silva de Lucca¹
Daiane Hansen²
Maria Luiza Vilela Oliva³

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE INIBIDORES
DE SERINOPROTEINASES ISOLADOS DE
SEMENTES DE *BAUHINIA BAUHINIOIDES*:
ESTIMATIVA DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA
E ESTUDOS DE pH**

RESUMO: Os inibidores de proteinases estão amplamente distribuídos na natureza. A sua atividade biológica nas plantas pode relacionar-se com a armazenagem de proteínas e com mecanismos de defesa contra agentes patogênicos e predadores. Estudos mostraram que estes inibidores podem desempenhar um importante papel na fisiopatologia de doenças humanas, como nas inflamações, hemorragias e câncer. Inibidores do gênero *Bauhinia* foram isolados, dentre eles, o inibidor de caliceína plasmática (BbKI) e o inibidor de elastase (BbCI), extraídos de sementes de *B. bauhinoides*. Eles possuem homologia com os inibidores do tipo Kunitz, porém não apresentam as pontes dissulfeto. Neste trabalho foi realizado um estudo comparativo estrutural entre estes, com o intuito de relacionar a estrutura e a especificidade. Foram utilizadas as técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular (CD) e fluorescência, que possibilitaram estimar o conteúdo de estrutura secundária e monitorar as alterações conformacionais destes inibidores em função do pH. O conteúdo estimado para os inibidores foi muito similar (2% de hélices- α , 36% de folhas- β , 23% de voltas- β e 39% de desordenada). A ausência de diferenças significativas nos espectros de CD e fluorescência dos inibidores, em ampla faixa de pH (2,0-10,5), sugere a grande estabilidade conformacional desse inibidor.

PALAVRAS-CHAVE: Inibidores de caliceína e elastase; Dicroísmo circular; Fluorescência.

Data de recebimento: 02/11/05. Data de aceite para publicação: 09/08/06.

¹ Biofísica. Pós-Doutoranda no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo. Professora Adjunta do Centro de Engenharias e Ciências Exatas na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste – Campus de Toledo (PR). Endereço eletrônico: rlucca@unioeste.br.

² Química. Doutoranda no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

³ Bioquímica. Professora Livre-Docente do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

SUMMARY: Proteinase inhibitors are largely distributed in nature. Their biological activity in the plants can be linked to the protein storage and to defense mechanisms against pathogenig and predator agents. Studies have shown that these inhibitors may play a significant role in the physiopathology of human diseases, such as inflammations, hemorrhage and cancer. Some inhibitors of *Bauhinia* were isolated, including the human plasma kallikrein inhibitor (BbKI) and the elastase inhibitor (BbCI), both of them isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds. They have homology with Kunitz-type inhibitors, but they do not present disulfide bridges. A structural comparative study was carried out on these inhibitors, aiming at relating their structure and their specificity. The following spectroscopic techniques were used: Circular Dichroism (CD) and fluorescence. These techniques enabled to estimate the secondary structure content and to monitor conformational changes of inhibitors due to pH variations. The secondary structure content estimated for the inhibitors was very similar (2% α -helix, 36% α -sheet, 23% α -turn and 39% unordered). The absence of significant differences in the CD and fluorescence spectra in the range of pH 2.0-10.5 shows the strong conformational stability of the inhibitors.

KEYWORDS: Kallikrein and elastase inhibitors; Circular dichroism; Fluorescence.

1. INTRODUÇÃO

As plantas, principalmente as suas sementes, contêm grande quantidade de inibidores de proteinases, que são essenciais para a germinação, atuando principalmente como proteínas de reserva e na defesa contra herbívoros e patógenos (SHEWRY, 1995; SHEWRY & LUCAS, 1997). Os inibidores isolados de plantas, devido à variada especificidade de inibição enzimática que apresentam, permitem aplicações úteis para uma melhor compreensão de mecanismos biológicos como a coagulação sangüínea, fibrinólise e outros processos fisiológicos, pois estudos mostram que estas proteínas podem desempenhar um papel importante na fisiopatologia de doenças humanas, tais como inflamações, hemorragias e câncer (DECLERCK & IMREN, 1994; KENNEDY, 1994; SAMPAIO et al., 1996; OLIVA et al., 2000).

Inibidores de serinoproteinases são uma das classes mais estudadas e melhor caracterizadas. Desta classe fazem parte os inibidores das enzimas da cascata da coagulação, como a trombina e a calicreína plasmática humana, e os inibidores das enzimas digestivas, como a tripsina e a quimotripsina (Barret, 2001). As duas principais

famílias de inibidores presentes em vegetais são: Kunitz e Bowman-Birk. A maioria dos inibidores do tipo Kunitz são proteínas com massa molecular em torno de 20 kDa, e possuem baixo teor de cisteína (quatro resíduos), formando duas pontes dissulfeto. Apresentam uma ou duas cadeias polipeptídicas, e um único sítio reativo para proteinases, localizado na alça formada pela ponte dissulfeto próxima ao N-terminal da molécula. Geralmente, este grupo de inibidores possui o mesmo sítio reativo (Arg-Ser) e os resíduos vizinhos a este centro mostram alto grau de similaridade (RICHARDSON, 1991).

O estudo da biologia estrutural visa buscar conhecimentos para o desenvolvimento de produtos potencialmente úteis para a solução de problemas bioquímicos e, eventualmente, para conceber novos agentes terapêuticos.

Vários estudos têm centralizado esforços em purificar e caracterizar alguns inibidores protéicos para procurar relacionar a estrutura e a especificidade. Dentre eles, o inibidor de calicreína, BbKI, e o inibidor de elastase, BbCI, isolados das sementes de *Bauhinia bauhinioides* (Oliva et al., 1999; Oliveira et al., 2001), gênero popularmente conhecido como pata-de-vaca, devido ao formato de suas folhas. BbKI e BbCI, embora apresentem a mesma massa molecular (18 kDa) e similaridades, em regiões conservadas, com outros inibidores tipo Kunitz de plantas, não apresentam as pontes dissulfeto.

Esta característica peculiar sugere que estes inibidores possam constituir uma nova classe. Adicionalmente, estes inibidores extraídos da mesma espécie possuem 97% de similaridade entre as suas seqüências primárias, porém as suas especificidades inibitórias são bastante diversas. Portanto, um estudo estrutural comparativo em nível de estrutura secundária e terciária entre os inibidores BbKI e BbCI poderia auxiliar nos estudos de estrutura-especificidade.

Nestes estudos foram empregadas as espectroscopias de dicroísmo circular (CD – *circular dichroism*) e fluorescência intrínseca. O CD possibilitou estimar os conteúdos de estrutura secundária e monitorar as mudanças conformacionais nas estruturas secundárias induzidas pela variação de pH, enquanto a fluorescência permitiu acompanhar as mudanças conformacionais locais, em nível terciário, na microvizinhança dos resíduos de triptofano. Em seguida, para uma melhor compreensão dos resultados, serão apresentados os resumos destas técnicas.

1.1 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

O CD é observado quando uma molécula opticamente ativa, denominada cromóforo, absorve de forma diferente as componentes opostas de luz circularmente polarizada, à esquerda e à direita. Esta atividade ótica é causada pela assimetria do cromóforo. A conformação de uma molécula está intimamente relacionada à sua atividade ótica e, por isto, esta técnica é muito utilizada para monitorar mudanças conformacionais bem como para estimar o conteúdo de estrutura secundária de proteínas (WOODY, 1994).

Em proteínas, os principais grupos opticamente ativos são as ligações amida da cadeia peptídica, monitoradas na região do ultravioleta (UV) distante [190-250 nm]; as cadeias laterais aromáticas e as ligações dissulfeto, monitoradas no UV próximo [250-360 nm]. Portanto, o espectro de CD entre 190 e 250 nm (região ultravioleta distante) pode identificar diferentes tipos de estrutura secundária como hélices- α , folhas- β , voltas- β e estruturas desordenadas (WOODY, 1994; VENYANINOV & YANG, 1996). Para a estimativa da estrutura secundária são utilizados espectros puros de cada conformação acima citada, pois os espectros de CD de uma proteína, $S(l)$, podem ser analisados como uma combinação linear destes espectros puros, $B_k(l)$:

$$S(\lambda) = \sum_{k=1}^N f_k B_k(\lambda)$$

EQUAÇÃO I

onde N é o número de estruturas secundárias e f_k a fração da k -ésima estrutura secundária. Os vínculos para f_k são:

$$\sum_{k=1}^N f_k = 1 \quad \text{e} \quad f_k \geq 0$$

EQUAÇÃO II

Os espectros puros $B_k(l)$ são calculados a partir dos espectros de CD de um grupo de proteínas de referência de estrutura tridimensional resolvida, geralmente por difração de raios-X.

1.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência é muito utilizada para o estudo de alterações conformacionais em proteínas, baseando-se na emissão

da radiação eletromagnética devido a transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estados de menor energia. As proteínas contêm cromóforos intrínsecos, os resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, cuja fluorescência é altamente específica e sensível ao ambiente em que se encontram. Pequenas mudanças conformacionais envolvendo, em particular o triptofano, e/ou suas vizinhanças, induzem resultados distintos no espectro de emissão da fluorescência, no rendimento quântico ou no deslocamento do máximo de emissão (LAKOWICZ, 1983).

Isto ocorre porque o indol, o triptofano e seus derivados são muito sensíveis à polaridade do solvente e sentem seus efeitos gerais e específicos. Assim, os espectros de emissão dos resíduos de triptofano refletem a polaridade de seu meio ambiente. Por outro lado, em uma proteína a emissão da fluorescência é a soma das contribuições de seus fluoróforos individuais, que dependem do microambiente de cada resíduo, pequenas alterações neste microambiente são reveladas pela fluorescência. Portanto, essa técnica é capaz de estudar ocorrências de mudanças conformacionais locais, isto é, em nível terciário, principalmente na microvizinhança dos resíduos de aminoácidos aromáticos permitindo inferir-se sobre o microambiente destes resíduos no composto em estudo.

2. MATERIAIS

As sementes utilizadas foram coletadas na região do Pantanal, MS. Os reagentes químicos utilizados na purificação dos inibidores foram todos de grau P.A. A água utilizada na preparação foi a deionizada. As resinas DEAE-Sephadex A-50, Sepharose 4B e as colunas do sistema FPLC (Superose 12, Mono Q) foram adquiridas da Pharmacia Fine Chemicals. A resina de afinidade tripsina-Sepharose foi preparada no laboratório de Bioquímica da UNIFESP, conforme método descrito por Cuatrecasas (1970).

3. METODOLOGIAS

3.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS INIBIDORES

Os procedimentos utilizados para a extração e purificação dos inibidores foram detalhadamente descritos nas publicações de Oliva

et al., 1999 e Oliveira et al., 2001. Resumidamente, as sementes foram trituradas e homogeneizadas em um liquidificador com NaCl 0,15 M. Em seguida, o material foi centrifugado a 4000 g, a solução sobrenadante, denominada extrato bruto (EB), foi utilizada como material inicial da purificação. As proteínas do EB foram precipitadas com acetona gelada 80% (v/v), o sedimento foi separado por centrifugação e seco sob ar atmosférico, à temperatura ambiente. Posteriormente, o precipitado cetônico seco foi ressuspensão em NaCl, 0,15 M. A solução contendo os inibidores, após acerto de pH e condutividade, foi aplicada a uma coluna DEAE-Sephadex equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Após extensiva lavagem com o tampão de equilíbrio, o inibidor adsorvido foi eluído com 0,10 e 0,15 M de NaCl.

As atividades inibitórias do BbKI e do BbCI em cada etapa da purificação foram monitoradas pela inibição da tripsina e da elatase, respectivamente. As frações contendo as atividades inibitórias foram reunidas, dialisadas em água até que 50% da atividade inibitória estava precipitada. Este material ativo foi cromatografado em coluna de afinidade tripsina-Sepharose, para a retirada do BbKI. O material adsorvido nesta coluna (BbKI) foi eluído com KCL, 1M, pH 8,0. Ambos materiais (adsorvido, BbKI e não adsorvido, BbCI) foram recromatografados individualmente em coluna de gel filtração Superose 12 (sistema FPLC) e em coluna de troca iônica Mono Q (sistema FPLC).

3.2 ESPECTROSCOPIA DE CD

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-810 (*Jasco Corporation*, Japão) em cubeta circular de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram registrados em um intervalo de 195 a 250 nm, a 25 °C, com uma média de 8 varreduras utilizando-se BbKI (8 mM) e BbCI (8 mM) em tampão fosfato de sódio, borato de sódio e acetato de sódio (PBA) 5 mM, nos pHs 2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 9,0; 10,5 e 12,0.

Os resultados são apresentados em elipticidade molar residual $[q]$ em unidades de graus.cm².dmol⁻¹. Para as estimativas das frações de estrutura secundária foi utilizado o programa CDPro, que reúne os três programas de determinação de estrutura secundária, muito utilizados atualmente, Selcon3, ContinII e CDSSTR (Sreerama & Woody, 2000; Sreerama & Woody, 2004a). A solução final foi determinada por dois métodos: a) A combinação das frações individuais melhores determinadas por cada método (esta análise é baseada nos seus índices

de desempenho para cada grupo de proteínas de referência). b) A média das soluções apresentadas pelos três métodos.

A análise foi realizada utilizando-se 56 proteínas no grupo de referência (43 solúveis, 5 desordenadas e 13 de membrana). Este grupo, que combina espectros de proteínas solúveis com espectros de proteínas de membrana, geralmente obtém melhores resultados nas análises tanto de proteínas solúveis quanto nas análises de proteína de membrana (Sreerama & Woody, 2004b).

3.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As medidas foram realizadas em um fluorímetro K2 (*ISS, Fluorescence, Analytical and Biomedical Instrumentation-Illinois/ USA*) a 25°C, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de excitação foi 295 nm, portanto excitando-se somente os resíduos de triptofano, e a emissão monitorada de 300-305 a 400 nm. As concentrações de BbKI e BbCI utilizadas neste experimento foram de 4 mM e 3 mM, respectivamente, em tampão fosfato de sódio, borato de sódio e acetato de sódio (PBA) 5 mM, nos pHs 2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 9,0; 10,5 e 12,0. A absorvância em 280 nm dos inibidores não excedeu a 0,1 para evitar efeitos de filtro interno. A contribuição do solvente foi subtraída das amostras em cada pH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA

A espectroscopia de CD foi utilizada para comparar as conformações dos inibidores BbKI e BbCI, verificar possíveis diferenças e estimar o conteúdo entre as suas estruturas secundárias. A estrutura secundária é determinada pela seqüência dos aminoácidos de uma proteína, isto é, por sua estrutura primária. Estes inibidores possuem 83% de identidade seqüencial e 97% de similaridade entre suas estruturas primárias, portanto seus espectros de CD são muito semelhantes. Os espectros de CD do BbKI (8 mM) e do BbCI (8 mM), em PBA, pH 7,0, são caracterizados por uma banda de alta intensidade com mínimo em aproximadamente 199 nm, uma banda positiva pouco intensa com um máximo em torno de 232 nm e uma banda negativa não bem definida na região de 212-216 nm (FIGURA 1).

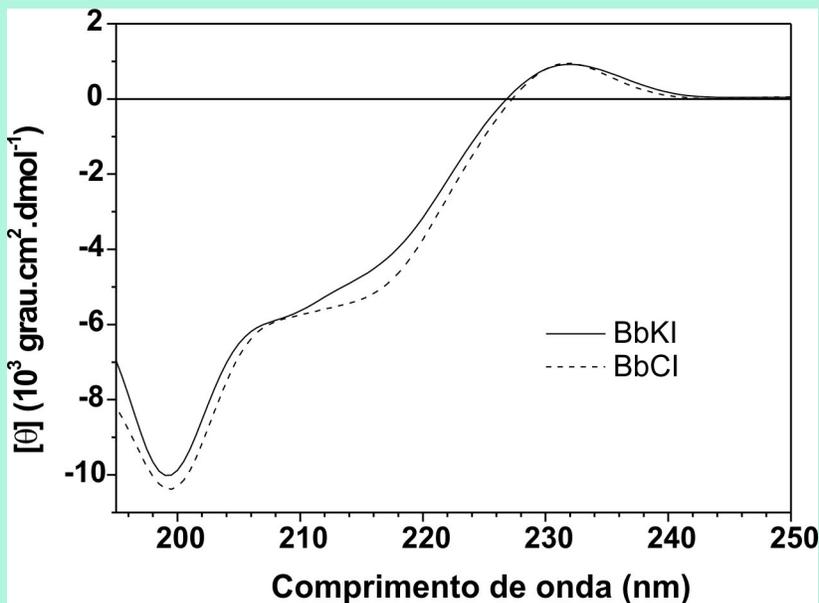


FIGURA 1 - Espectros de CD dos inibidores (8 mM) em tampão PBA 5 mM, pH 7,0. Os espectros foram registrados de 195 a 250 nm, a 25°C, com uma média de oito varreduras, em uma cubeta de quartzo cilíndrica de 1 mm de caminho ótico. A estimativa de estrutura secundária foi calculada pelo programa CDPPro (SREERAMA & WOODY, 2000).

A banda positiva em aproximadamente 230 nm, presente em ambos inibidores, é a interferência das cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos no CD das ligações peptídicas, a que se deve a quantidade de aminoácidos aromáticos presentes nestes inibidores. BbCI e BbKI possuem 9 e 3 resíduos de tirosina, respectivamente, 8 resíduos de fenilalanina e um único resíduo de triptofano cada um, representando aproximadamente 10% e 8% do número de aminoácidos total das suas cadeias polipeptídicas. Por outro lado, bandas positivas e negativas na região de 200 nm são representativas das estruturas folhas- β e desordenadas, respectivamente. Porém, o conjunto destas bandas características sugere que estes inibidores pertençam a um subgrupo da classe de proteínas *rich-b* (alto conteúdo da conformação β), denominado β -II (Manavalan & Johnson, 1983; Wu *et al*, 1992).

Os espectros de CD desta subclasse apresentam uma banda negativa intensa em torno de 200 nm, semelhante aos espectros de

proteínas de estruturas desordenadas. O programa CDPro foi utilizado para verificar a classe referente aos inibidores (*rich-a*; *rich-b*, *a+b*; *a/b* ou desordenada), e confirmou que ambos pertencem à classe de proteínas *rich-b*. Pertencem a este subgrupo, dentre outras, as enzimas quimotripsina, elastase e o inibidor de tripsina extraído das sementes do feijão-soja (STI). STI foi o primeiro inibidor a ser isolado por Kunitz em 1946. Este inibidor apresenta 27% e 28% de identidade seqüencial na estrutura primária com BbCI e BbKI, respectivamente.

O programa CDPro foi empregado para estimar o conteúdo de estrutura secundária dos inibidores. A análise foi realizada utilizando-se o banco de referência com 56 proteínas, os dados são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Estimativas de estrutura secundária para BbKI e BbCI

MÉTODO	H (%)		B (%)		T (%)		U (%)	
	BbKI	BbCI	BbKI	BbCI	BbKI	BbCI	BbKI	BbCI
ContinII	4	4	36	37	22	22	38	38
CDSSTR	2	3	36	34	23	23	39	40
Média	3	4	36	36	23	22	38	39
Combinação	2	2	36	34	23	23	39	40

Estruturas: H - hélice-a; B - folha-b; T - volta-b; U - desordenada.
Desvio médio quadrático (RMS): 3%<RMS<5%.

A análise a partir do programa Selcon3 foi excluída, pois o resultado apresentou um desvio médio quadrático (RMS – *root mean square*) muito alto (maior que 12%) em relação aos demais programas. Os resultados finais foram obtidos como descrito na metodologia. Pela observação dos resultados parciais ou finais para as estimativas dos inibidores nota-se que o conteúdo de estrutura secundária destes é realmente muito similar. Pode-se também notar que o conteúdo estimado para cada inibidor é semelhante, independente do método (ContinII e CDSSTR) ou da maneira utilizada para o cálculo do resultado final (média ou combinação). Os desvios RMS entre a curva experimental e o ajuste teórico dos programas ficaram entre 3 e 5%. Adicionalmente, as estimativas para estes inibidores assemelham-se às frações determinadas para o STI, que apresenta 2% de hélice-a, 38% de folha-b, 23% de volta-b e 37% de estrutura desordenada. Estes fatores reunidos demonstram a confiabilidade da desconvolução.

4.2 ESTABILIDADE CONFORMACIONAL EM FUNÇÃO DO PH

As espectroscopias de CD e fluorescência foram utilizadas para investigar as possíveis modificações conformacionais dos inibidores. A excitação em 295 nm seleciona apenas os resíduos de triptofano, que, embora em menor quantidade, possuem maior rendimento quântico (Lakowicz, 1983). Os espectros de emissão de fluorescência dos inibidores BbKI (4,0 mM) e BbCI (3,0 mM), pH 7,0, são apresentados nas FIGURAS 2a e 2b (-|-), respectivamente. Estes espectros apresentam o máximo da emissão da fluorescência em torno de 323 nm, característico de resíduos de triptofanos não expostos ao solvente, isto é, protegidos no interior da molécula. Notam-se somente alterações na intensidade da emissão de fluorescência para ambos inibidores na faixa de pH 2,0-10. O comportamento destas alterações difere, porém, entre os inibidores, pois, enquanto para o inibidor BbKI a intensidade de fluorescência diminui em pHs básicos, para o inibidor BbCI este comportamento é observado na faixa de pHs ácido e básico, ou seja, o valor máximo da intensidade de emissão ocorre quando este inibidor se encontra em pH neutro. A diminuição da intensidade de fluorescência indica que algum mecanismo de supressão de fluorescência está presente. Esta supressão pode ser decorrente de alterações na microvizinhança dos resíduos de triptofano. Por outro lado, em pHs alcalinos ocorre a supressão da fluorescência do triptofano para diversas proteínas (Steiner & Edelhoich, 1967). Um modelo proposto na literatura para esta supressão alcalina baseia-se na transferência de energia do estado excitado do triptofano para a tirosina ionizada. Este processo competiria com a emissão direta resultando na supressão da emissão.

Na faixa de pH 10,5-12,0, além de intensa supressão, houve um deslocamento do máximo da emissão para a região do vermelho (325 nm em pH 10,5 e 330 nm em pH 12,0) para ambos inibidores. O deslocamento do máximo da emissão reflete a mudança de polaridade do meio ambiente do fluoróforo, sugerindo que acima do pH 10,5 os resíduos de triptofano dos inibidores BbKI e BbCI estão ligeiramente mais expostos ao solvente. Entretanto, deve-se ressaltar que estes deslocamentos batocrômicos podem não estar ligados a uma mudança estrutural terciária dos inibidores, mas refletir a desprotonação do grupamento $-NH_3^+$ dos resíduos de triptofano. Esta forma aniônica está presente acima de pH 9,6, com $pK_a > 15$ (Bridges and Williams, 1967). Por outro lado, supondo que o deslocamento batocrômico dos espectros de emissão dos triptofanos dos inibidores seja devido a um aumento

na exposição dos fluoróforos, esta exposição ainda não é a característica de proteínas desnaturadas, que geralmente têm os seus máximos deslocados para aproximadamente 340 nm. Portanto, baseados nos espectros de emissão da fluorescência dos triptofanos do BbKI e do BbCI, verifica-se que estes resíduos não são totalmente expostos ao solvente mesmo em pHs extremos, sugerindo que a sua estrutura terciária se mantenha inalterada. Contudo, estudos utilizando fluoróforos extrínsecos, como a sonda ANS, sensível à polaridade do solvente, poderiam revelar um panorama global da estrutura destes inibidores, visto que os resíduos aromáticos fornecem informações mais localizadas (Lakowicz, 1983). Estes estudos poderiam esclarecer a real origem do deslocamento para a região do vermelho.

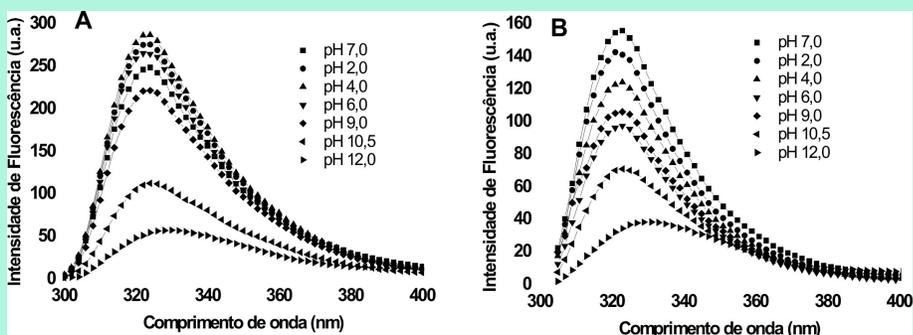


FIGURA 2 - Espectros de emissão da fluorescência dos inibidores BbKI (4 μ M) e BbCI (3 μ M) em diferentes pHs. (A) BbKI e (B) BbCI. As amostras foram incubadas em tampão PBA, 5mM, nos pHs acima citados. Os espectros foram registrados de 300-305 a 400 nm, com excitação em 295 nm, em uma cubeta retangular de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

Na FIGURA 3 são apresentados os espectros de CD dos inibidores BbKI (8 mM) e BbCI (8 mM) em função do pH. As amostras foram incubadas nos seguintes pHs: 2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 9,0, 10,5 e 12,0, a 25°C. São apresentados apenas três espectros de CD para cada inibidor devido à semelhança entre os demais espectros. Pode-se observar que não ocorreram alterações significativas nos espectros de CD dos inibidores.

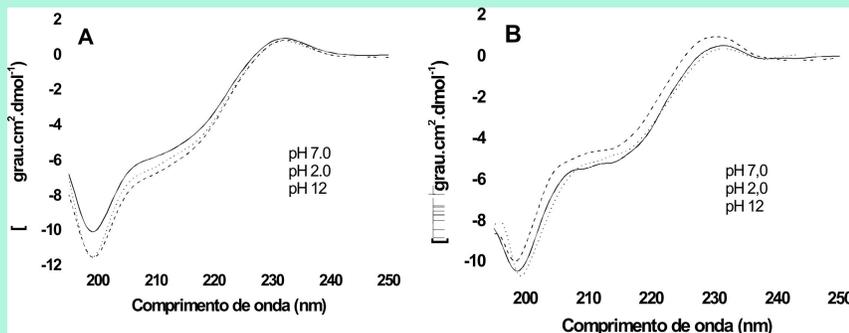


FIGURA 3 - Espectros de CD dos inibidores como função do pH. (A) BbKI e (B) BbCI. Medidas registradas nas mesmas condições descritas na Figura 1, porém, as amostras foram incubadas em tampão PBA, 5 mM nos seguintes pHs: 2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 9,0, 10,5 e 12,0, a 25°C.

A ausência de alterações significativas nos espectros de CD (estrutura secundária) e nos espectros de fluorescência (estrutura terciária), em uma ampla faixa de pH (2,0-12,0 para estrutura secundária e 2,0-10,0 para a estrutura terciária), sugere a alta estabilidade conformacional desses inibidores. Este comportamento estrutural é similar ao do STI, que têm as suas estruturas secundária e terciária inalteradas na faixa de pH 6,0-9,0, e acima deste uma pronunciada supressão da fluorescência ocorre. Por outro lado, em pHs ácidos o comportamento é diverso, pois um aumento contínuo da intensidade de fluorescência é observado abaixo do pH 6,0, acompanhado por um deslocamento do máximo da emissão do triptofano do STI para a região do vermelho (Steiner & Edelhoch, 1963). Sendo assim, STI é mais suscetível a mudanças estruturais em pHs ácidos que os inibidores em estudo.

Em geral, os inibidores do tipo Kunitz apresentam-se muito estáveis quando submetidos à desnaturação ácida, térmica ou química (Apenten & Mahadevan, 1999; Azarkan et. al, 2006). Esta estabilidade pode estar relacionada com a participação dos inibidores no mecanismo de defesa das plantas. BbKI e BbCI possuem a estabilidade que caracteriza a funcionalidade deste tipo de proteína, mesmo na ausência das pontes dissulfeto. A descrição desses novos inibidores da família Kunitz, sem as pontes dissulfeto, nos levou a questionar a importância das mesmas e a sua função na estabilização da alça que delimita o sítio reativo. Os espectros de CD do inibidor STI e do inibidor de tripsina isolado de *Erythrina caffra* (ETI) são idênticos. Porém, após a redução das pontes, o espectro de CD do ETI não é alterado significativamente,

enquanto o espectro do STI muda drasticamente (LEHLE et al., 1994; TETENBAUN & MILLER, 2001).

Estes estudos espectroscópicos são corroborados pelos estudos da atividade inibitória, pois a atividade do ETI não é modificada pela ação dos agentes redutores enquanto o STI é inativado. Portanto, a importância que as pontes dissulfeto desempenham na estabilização dos inibidores de proteinases de origem vegetal do tipo Kunitz é bastante variada. Algumas características que distinguem os dois inibidores, dentre elas a hidrofobicidade, são fatores relevantes para a manutenção da estrutura secundária. O STI possui maior número de resíduos hidrofóbicos e as pontes S-S são importantes para prevenir o colapso das regiões hidrofóbicas da proteína.

A estabilidade estrutural no caso de BbKI e BbCI, que possuem muitos aminoácidos hidrofílicos, como o inibidor ETI, provavelmente é mantida por outras interações, como pontes de hidrogênio e pontes salinas, responsáveis por manter a rigidez estrutural, que nos inibidores do tipo Kunitz clássicos são mantidas pelas ponte dissulfeto.

5. CONCLUSÕES

A espectroscopia de dicroísmo circular revelou que ambos inibidores possuem conteúdo alto de folhas beta e pertencem a um subgrupo da classe de proteínas *rich-b* (alto conteúdo da conformação b), denominado b-II. Esta característica é comum na maior parte dos inibidores de proteases e relaciona-se com sua alta estabilidade proporcionada por este arranjo estrutural. As estimativas de estrutura secundária apresentadas sugerem que as variações sutis nas estruturas primárias destes inibidores são responsáveis pela sua especificidade inibitória enzimática, visto que as suas estruturas secundárias são muito similares entre si.

A emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano dos inibidores mostra que estes resíduos se encontram em um ambiente mais hidrofóbico.

A estabilidade estrutural dos inibidores frente à variação de pH é sugerida pelos dados de CD e fluorescência, e é característica dos inibidores do tipo Kunitz. Devido à ausência de pontes dissulfeto, presume-se que esta estabilidade é conduzida por outras interações químicas. Peculiaridades mais específicas poderão ser esclarecidas com os respectivos estudos cristalográficos.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Profa. Dra. Leila M. Beltramini, Líder do Grupo de Biofísica Molecular, IFSC, USP, por disponibilizar o espectrofluorímetro para a realização destes experimentos. Os autores também agradecem às agências de fomento CNPq, FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS

- APERTEN, R. K. O.; MAHADEVAN, K. *The heat resistance and conformational plasticity of kunitz soybean trypsin inhibitor. J. of Food Biochem.*, v. 23, p. 209-224, 1999.
- AZARKAN, M; DIBIANI R., GOORMAGHTIGH, E.; RAUSSENS, V.; BAEYENS-VOLANT, D. *The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor his a highly stable beta sheet-protein glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta*, v. 1764, p. 1063-1072, 2006.
- BARRET, A. J. *Proteolytic enzymes: nomenclature and classification*. In: BEYMON, R; BOND, J. S. (Eds.). *Proteolytic enzymes*. 2 nd. Oxford: University Express, 2001.
- BRIDGES, J. W.; WILLIAMS, R. T. *The fluorescence of indoles and anilines derivatives. Biochem. J.*, v.107, p. 225-237.
- CUATRECASAS, P. *Protein purification by affinity chromatography. J. Biol. Chem.*, v. 245, p. 3059-3065, 1970.
- DE CLERCK, Y. A.; IMREN, S. *Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. Eur. J. Cancer*, v. 30, p. 2170-80, 1994.
- KENNEDY, A. R. *Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. Cancer Research*, v. 54, p. 1999S-2005S, 1994.
- LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983.
- LEHLE, K.; WRBA, A.; JAENICKE, R. *Erythrina caffra trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. J. Mol. Biol.*, v. 239, n. 2, p. 276-84, 1994.
- MANAVALAN, P.; JOHNSON, W.C. *Sensitivity of circular-dichroism to protein tertiary structure class. Nature*, v. 305, n. 5937, p. 831-832.

OLIVA, M. L.; MENDES, C. R.; JULIANO, M.; CHAGAS, J. R.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M. *Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from B. bauhinioides seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. Immunopharmacology*, v. 45, p. 163-169, 1999.

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, M. U.; SAMPAIO, C. A. M. *Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology*, v. 1477, n. 1, p. 64-74, 2000.

OLIVEIRA, C.; SANTANA, L. A.; CARMONA, A. K.; CEZARI, M. H.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M.; OLIVA, M. L. V. *Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from Bauhinia bauhinioides seeds. Biological Chemistry*, v. 382, n. 5, p. 847-852, 2001.

RICHARDSON, M. *Seed storage proteins: The enzyme inhibitors*. In: —. *Methods in plant biochemistry*. New York: Academic Press, 1991, v. 5, p. 259-305.

SAMPAIO, C. A. M.; OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, M. U.; BATISTA, I. F. C.; BUENO, N. R.; TANAKA, A. S.; AUERSWALD, E. A.; FRITZ, H. *Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. Immunopharmacology*, v. 32, p. 62-66, 1996.

SHEWRY, P. R. *Plant storage proteins. Biol. Rev.*, v. 70, p. 375-426, 1995.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. *Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, v. 26, p. 135-192, 1997.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR. Methods with an expanded reference set. Analytical Biochemistry*, v. 287, p. 252-260, 2000.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. *Computation and analysis of proteins circular dichroism spectra. Methods in Enzymology*, v. 383, p. 318-351, 2004a.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. *On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. Protein Science*, v. 13, n. 1, p. 100-112, 2004b.

STEINER, R. F.; EDELHOCH, H. *Structural transitions of soybean trypsin inhibitor. Journal of Biological Chemistry*, v. 238, n. 3, p. 925-928, 1963.

TETENBAUM, J.; MILLER, L. M. *A new spectroscopic approach to examining the role of disulfide bonds in the structure and unfolding of soybean trypsin inhibitor. Biochemistry*, v. 40, p. 12215-12219, 2001.

VENYAMINOV, S. Y.; YANG, J. T. *Determination of protein secondary structure. In: FASMAN, GD (Ed.). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York: Plenum, 1996, p. 69-107.*

WOODY, R. W. *Circular dichroism of peptides and proteins. In: NAKANISHI, K.; BEROVA, N.; WOODY, R. W. (Eds.). Circular dichroism: principles and applications. New York: VCH Publishers, 1994, p. 473-521.*

WU, J.; YANG, J. T.; WU, C. S. C. *Beta-II conformation of all-beta proteins can be distinguished from unordered form by circular-dichroism. Analytical Biochemistry*, v. 200, n. 2, p. 359-364, 1992.

Unioeste
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
— www.unioeste.br —

REVISTA VARIA SCIENTIA

Versão eletrônica disponível na internet:

www.unioeste.br/saber

V A R I A
S C I E N T I A