



**Universidade de Brasília – UnB**  
Instituto de Ciências Biológicas – IB  
Departamento de Biologia Celular – CEL  
Laboratório de Biofísica

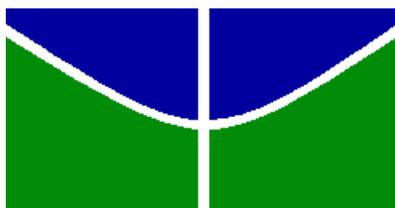
---

**EFEITO DO INIBIDOR DE SERINOPROTEASES *BLACK-EYED PEA*  
*TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN INHIBITOR (BTCI)* NA AÇÃO  
HIPOTENSORA DE BRADICININA E ANÁLOGOS**

Alice da Cunha Morales Álvares

Brasília

Dezembro- 2014



**Universidade de Brasília – UnB**  
Instituto de Ciências Biológicas – IB  
Departamento de Biologia Celular – CEL  
Laboratório de Biofísica

---

**EFEITO DO INIBIDOR DE SERINOPROTEASES *BLACK-EYED PEA*  
*TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN INHIBITOR (BTCI)* NA AÇÃO  
HIPOTENSORA DE BRADICININA E ANÁLOGOS**

Alice da Cunha Morales Álvares

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria de Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília

Dezembro- 2014

## **BANCA EXAMINADORA**

Profª Drª SÔNIA MARIA DE FREITAS **(PRESIDENTE)**

Laboratório de Biofísica Molecular  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. LUCIANO PAULINO DA SILVA **(COORDENADOR)**

Matrícula: 01011201  
Laboratório de Espectrometria de Massa  
Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia

Profª Drª BEATRIZ SIMAS MAGALHÃES **(EXAMINADOR EXTERNO)**

CPF: 846458811-91  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia  
Universidade Católica de Brasília- UCB

Profª. Drª ANDRÉA BARRETTO MOTOYAMA **(EXAMINADOR)**

Matrícula: 1019180  
Laboratório de Patologia Molecular do Câncer  
Departamento de Farmácia  
Faculdade de Ciências da Saúde- UnB

Profª. Drª. GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI **(EXAMINADOR)**

Matrícula: 1059581  
Faculdade da Ceilândia  
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. JOÃO ALEXANDRE RIBEIRO GONÇALVES BARBOSA **(EXAMINADOR)**

Matrícula: 1061895  
Laboratório de Biofísica Molecular  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília – UnB

Drª AZADEH MEHDAD **(SUPLENTE)**

Laboratório de Biofísica Molecular  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília – UnB

*A Deus, que me auxiliou em todos os obstáculos. Sempre estive protegida e abençoada por Ele. Deus, minha fonte de energia.*

*Aos meus amados pais, Antonio Morales Álvares e Delir Luíza da Cunha Morales, que são minha base de vida e minha fonte de exemplos.*

*As minhas irmãs Renata e Luciana que auxiliaram na minha criação e sempre me trataram com muito carinho.*

*Ao meu namorado e companheiro André Luiz Pedrosa Ferreira que acompanhou o último ano do meu doutoramento. Foi essencial em diversas etapas deste período e me ensinou muito com seu jeito gentil e carinhoso.*

*À professora Dr.<sup>a</sup> Regina Buani, com toda sua classe e sabedoria, orientou a mim no desenvolvimento do meu projeto de conclusão do curso de*

*Farmácia pela Faciplac e incentivou-me a seguir a área acadêmica.*

*Ao diretor da Faciplac, professor Dr. Walter Paulo, uma pessoa excelente e de grande reconhecimento. Participou da banca de defesa de meu projeto de conclusão de curso. Suas palavras “não pare por aí, Alice” foi que me incentivaram a seguir esta área acadêmica.*

*À minha querida professora Dr<sup>a</sup> Sonia Maria de Freitas que serviu de instrumento de Deus para eu iniciar a pós-graduação em Biofísica Molecular. Recebeu-me com carinho e muita paciência. Compreendeu minhas dificuldades e orientou-me como filha. Passou sempre muita segurança e incentivo.*

*Ao meu querido professor Dr Luciano Paulino da Silva, sempre muito atencioso acompanhou as etapas deste trabalho e disposto a ajudar.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre ouvir minhas preces.

Aos meus pais, Antonio Morales Álvares e Delir Luiza da Cunha Morales, que me compreenderam nos momentos mais difíceis desta etapa acadêmica, transmitindo-me muito apoio e confiança.

As minhas irmãs Renata e Luciana com as quais posso contar sempre.

Ao meu namorado André que se mostrou companheiro e leal nas horas difíceis.

À professora e orientadora da graduação, Regina Buani, que sempre depositou sua confiança em mim, acreditando em meu potencial, aumentando minha confiança para vencer todos os obstáculos de minha vida.

Ao diretor da Faciplac, Dr. Walter Paulo, pelo carinho e atenção durante e após a graduação. Obrigada pela dedicação, educação e exemplo por todos esses anos.

Aos meus queridos amigos que compõem a equipe de Biofísica pelo bom convívio durante esses quatro anos, pelo socorro nos momentos difíceis. Agradeço pelas discussões, pelas explicações esclarecedoras e pelas alegrias.

Aos alunos da equipe de colaboração profa. Dra. Elisabeth Schwartz (UnB) e prof. Dr. Gustavo Pedrino (UFG).

Ao técnico de laboratório Francisco, que ajudava sempre e de forma imediata, com muita competência e boa vontade.

À Ana, secretária da pós-graduação em Biologia Molecular, com sua competência e excelente trabalho.

Ao LNLS por possibilitar nossas pesquisas de DLS.

Aos amigos de todas as horas, Amanda Souza e Eduardo Fernandes, que transmitiram todos seus conhecimentos, com paciência, repetia quantas vezes fossem precisas. Obrigada pelos momentos de alegria, de confiança, de confiança.

Aos professores Sonia Maria de Freitas e Luciano Paulino da Silva que sempre dispostos a ensinar e colaborar visando meu crescimento intelectual, moral e profissional. Obrigada pela oportunidade de realizar um trabalho incessante e satisfatório ao lado dos senhores.

Ao CNPq pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo.

A todos aqueles que contribuíram em minha caminhada, de forma direta e indireta, recebam o meu muito obrigada, carinhosamente.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Formação de angiotensina II a partir da ação do sistema renina-angiotensina. As setas sólidas representam reações convencionais e as setas tracejadas as reações alternativas não convencionais. Fonte: GOODMAN e GILMAN, 2005.....7
- Figura 2. Metabolismo da bradicinina. A Bk é inativada por proteases, que atuam nas posições específicas, como indicado pelas setas. Fonte: GOODMAN e GILMAN, 2005.....11
- Figura 3. Mecanismo de ação geral (catálise ácida e básica) das serinoproteases. Hedstrom, 2002.....14
- Figura 4. Sementes maduras de *Vigna unguiculata* (JOANITTI, 2008).....17
- Figura 5. Estrutura tridimensional do BTCl (BARBOSA et al, 2007; código no pdb 2G81).....18
- Figura 6. Complexo BTCl-quimotripsina. A primeira figura corresponde à interação entre o BTCl e a quimotripsina em que as cores azul e rosa representam as regiões dos sítios reativos do BTCl. A segunda figura representa os resíduos do BTCl e da quimotripsina envolvidos no processo de interação.....19
- Figura 7. Purificação dos peptídeos Bk, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>. **A)** Cromatogramas dos peptídeos eluídos sob gradiente de acetonitrila (ACN) de 5-95% em coluna de fase reversa semipreparativa 218TP510, utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A absorbância foi monitorada em 216 nm. **B)** Espectros de massa MALDI-

TOF/MS representando a massa molecular  $[M+H]^+$  e o grau de pureza dos peptídeos.....54

Figura 8. Intensidade de fluorescência de serinoproteases, registrada em 331,5 nm para tripsina e 332 nm para quimotripsina, dependente do tempo, na presença de Bk e dos análogos a 37°C. **A)** Quimotripsina em tampão Tris-HCl 50 mM,  $CaCl_2$  20 mM pH 7,6. **B)** Tripsina em tampão Tris-HCl 50 mM,  $CaCl_2$  20 mM pH 8,2. IF é intensidade de Fluorescência.....55

Figura 9. Espectros de emissão de fluorescência de serinoprotases dependente do tempo (0 a 60 minutos) a 37 °C. **A)** Quimotripsina em tampão Tris-HCl 50 mM,  $CaCl_2$  20 mM pH 7,6. **B)** Tripsina em tampão Tris-HCl 50 mM,  $CaCl_2$  20 mM pH 8,2. IF é intensidade de fluorescência.....57

Figura 10. Atividade residual relativa de serinoproteases na presença de diferentes concentrações de peptídeos (0-1,0  $\mu$ M). A barra na cor branca representa o ensaio para Bk, as barras em cinza escuro e cinza claro representam os ensaios para os análogos  $Bk_1$  e  $Bk_2$ , respectivamente. **A)** Quimotripsina ( $630 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em Tris-HCl 50 mM  $CaCl_2$  20 mM pH 7,6 a 37°C. **B)** Tripsina ( $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em tampão Tris-HCl 50 mM,  $CaCl_2$  20 mM pH 8,2.....58

Figura 11. Hidrólise da Bk e dos análogos por **A)** quimotripsina e **B)** tripsina. Concentrações utilizadas: Bk,  $Bk_1$  e  $Bk_2$  (10,0  $\mu$ M), quimotripsina (10,0  $\mu$ M) e tripsina (10,0  $\mu$ M). 100% corresponde ao total de Bk e análogos adicionados ao sistema. Fragmentos Bk (1-5) e (1-8): hidrólise de Bk e dos análogos por quimotripsina após resíduos Phe. Fragmentos Bk (2-9) e dos análogos (1-9): hidrólise de Bk e dos análogos, respectivamente, por tripsina após resíduos Arg.....59

- Figura 12. Ação constritora de  $Bk_1$  e  $Bk_2$ , previamente incubados com tripsina, sobre músculo liso de íleo de cobaia em diferentes concentrações (1,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ ). Os dados de Bk foram utilizados como controle positivo.  $P < 0,05$ , comparado com a Bk à mesma concentração.....**62**
- Figura 13. Espectros de dicroísmo circular “distantes do UV” da Bk e análogos ( $Bk_1$  e  $Bk_2$ ) em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C.....**65**
- Figura 14. Medidas da Intensidade de Luz Espalhada por DLS, pelos peptídeos e pelo inibidor BTCl em função do diâmetro hidrodinâmico. Estados oligoméricos da Bk e dos análogos (25  $\mu\text{M}$ ) **A**) do BTCl (25  $\mu\text{M}$ ) **B**) dos complexos formados entre o inibidor e os peptídeos (25  $\mu\text{M}$ ) **C**) em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C.....**71**
- Figura 15. Espectros de dicroísmo circular “distantes do UV” do BTCl e complexos com a bradicinina (BTCl:Bk) e análogos (BTCl: $Bk_1$  e BTCl: $Bk_2$ ) em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C.....**73**
- Figura 16. Gráfico de Stern-Volmer para a interação BTCl (25  $\mu\text{M}$ ) com concentrações crescentes de bradicinina e dos análogos (25  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$ ), em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C.  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência do inibidor na ausência e presença da bradicinina/análogos, respectivamente.....**76**
- Figura 17. Log ( $F_0-F/F$ ) versus Log [peptídeo] do BTCl (25  $\mu\text{M}$ ) com concentrações crescentes de peptídeos (25 a 500  $\mu\text{M}$ ), em tampão Tris-HCl 2 mM a 37°C **A**) pH 5,0 **B**) 7,4 **C**) 9,0.  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência do inibidor na ausência e presença da bradicinina/análogos, respectivamente.....**78**

Figura 18. Atividade inibitória do BTCI para serinoproteases na presença de concentrações crescentes de bradicinina e dos análogos (0 a 10  $\mu\text{M}$ ). **A)** Atividade residual de quimotripsina na presença do inibidor a 40  $\mu\text{M}$  na forma complexada aos peptídeos. **B)** Atividade residual de tripsina na presença do inibidor a 10  $\mu\text{M}$  na forma complexada aos peptídeos.  $P < 0,05$  quando comparado com todos os outros na mesma concentração.....**80**

Figura 19. Ação da Bk sobre o músculo liso de íleo de cobaia (*Cavia porcellus*), na ausência e presença do BTCI. Não foram apresentados os valores para os análogos devido ao BTCI ter inibido a degradação deles pelas serinoproteases, não sendo possível o registro da força de contração (g).....**82**

Figura 20. Efeitos hemodinâmicos induzidos por administrações intravenosas de BTCI (0,3, 3, 30 and 300  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  of b.wt, in 0,1 mL) ou Veículo (V; NaCl 0,9%) em ratos anestesiados. **A)** Pressão Arterial Média (PAM). **B)** Condutância Vascular Renal (CVR). **C)** Condutância Vascular Aórtica (CVA). Os resultados foram expressados como média de  $\pm$  SEM de 6 experimentos. \*  $P < 0,05$  comparado ao V.....**84**

Figura 21. Efeitos hemodinâmicos da Bk e análogos na ausência e presença do BTCI. **A)** Pressão Arterial Média (MAP). **B)** Condutância Vascular Renal (CVR). **C)** Condutância Vascular Aórtica (CVA). \* $P < 0,05$  comparado ao veículo; # comparado ao BTCI, \$ comparado ao Bk; † comparado ao Bk<sub>2</sub>.....**86**

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Sequência de aminoácidos da bradicinina e análogos.....	<b>3</b>
Tabela 2. Conteúdo de estruturas secundárias do BTCl e dos complexos BTCl: Bks.....	<b>73</b>
Tabela 3. Constantes de Stern-Volmer dos complexos BTCl-Bks em diferentes pHs.....	<b>77</b>
Tabela 4. Constantes de ligação $K_b$ e sítios de ligação ( $n$ ) dos complexos BTCl:Bks em diferentes pHs.....	<b>78</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**Å** = ångström

**ACN** = acetonitrila

**Ala** = alanina

**Asp** = asparagina

**Arg** = arginina

**Asp** = ácido aspártico ou aspartato

**AT<sub>1</sub>** = receptor angiotensinérgico 1

**BAPNA** = *N*α-benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride

**Bk** = bradicinina

**Bk<sub>1</sub>** = análogo 1 de bradicinina

**Bk<sub>2</sub>** = análogo 2 de bradicinina

**BBI** = Inibidor da família Bowman-Birk, do inglês *Bowman-Birk inhibitor*

**BTCI** = *Black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor*

**cAMP** = adenosine monofosfato cíclico

**CaCl<sub>2</sub>** = cloreto de cálcio

**cGMP** = guanosina monofosfato cíclico

**C-terminal** = carboxi-terminal

**CVA** = condutância vascular aórtica

**CVR** = condutância vascular renal

**Cys** = cisteína

**Da** = Dalton

**DAG** = diacilglicerol

**DC** = dicroísmo circular

**DCM** = diclorometano

**DIC** = diisopropilcarbodimida

**DIPEA** = N, N-diisopropiletilamina

**DLS** = espalhamento de luz dinâmico, do inglês *dynamic light scattering*

**DMAP** = dimetilaminopiridina

**DMF** = dimetilformamida

**DTE** = ditioeritritol

**ECA** = enzima conversora de angiotensina

**EDHF** = fator hiperpolarizante derivado do endotélio, do inglês endothelial  
derived  
hyperpolarization factor

**EDRF** = fator de relaxamento derivado do endotélio, do inglês endothelial derived  
relaxation factor

**E.P.M** = erro padrão da média

**F** = intensidade de fluorescência na presença de atenuador

**F<sub>0</sub>** = intensidade de fluorescência na ausência de atenuador

**FC** = frequência cardíaca

**Fmoc** = 9-fluorenilmetoxycarbonila

**FSA** = fluxo sanguíneo aórtico

**FSR** = fluxo sanguíneo renal

**g** = grama

**Gln** = glutamina

**Glu** = ácido glutâmico ou glutamato

**Gly** = glicina

**GPNA** = N - *glutaryl* - L - *phenylalanine* - p - *nitroanilide*

**GTP** = guanosina trifosfato

**HBTU** = hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1-1-3-3-tetrametilurônio

**HCl** = ácido clorídrico

**His** = histidina

**HMWL** = cininogênio de alto peso molecular, do inglês high molecular weight  
kininigen

**IP<sub>3</sub>** = inositol trifosfato

**K<sub>b</sub>** = constante de ligação

**KCN** = cianeto de potássio

**kDa** = kilo Dalton

**Kg** = quilograma

**KI<sup>-</sup>** = iodeto de potássio

**K<sub>SV</sub>** = constante de Stern-Volmer

**Leu** = leucina

**LMWL** = cininogênio de baixo peso molecular, do inglês low molecular weight  
kininigen

**Lys** = lisina

**M** = Molar

**MALDI-TOF/TOF** = Ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada  
ao tempo de voo, do inglês *matrix-assisted laser  
desorption/ionization coupled to time-of-flight*

**MCF-7** = *Michigan Cancer Foundation*

**MFA** = microscopia de força atômica

**mg** = miligrama

**MgCl<sub>2</sub>** = cloreto de magnésio

**mL** = mililitro

**mM** = milimolar

**mmol** = milimol

**n** = número de sítios de ligação

**NaCl** = cloreto de sódio

**NaHCO<sub>3</sub>** = bicarbonato de sódio

**NaOH** = hidróxido de sódio

**nM** = nanomolar

**NO** = óxido nítrico

**NOS** = óxido nítrico sintase

**N-terminal** = amino-terminal

**p-nitroanilina** = para-nitroanilina

**PAM** = pressão arterial média

**PAS** = pressão arterial sistêmica

**PAST** = software de estatística para análise de dados

**PDB** = *Protein Data Bank*

**pH** = potencial hidrogeniônico

**Phe** = fenilalanina

**PMSF** = fluoreto de metilfenilsulfonil

**Pro** = prolina

**Q** = atenuador

**RP-HPLC** = cromatografia líquida de alta performance de fase reversa, do inglês *reverse-phase high performance liquid chromatograph*

**rpm** = rotação por minuto

**Ser** = serina

**SRAA** = sistema renina-angiotensina-aldosterona

**STa** = enterotoxina termoestável

**tBu** = *tert-butyl*

**t-butila** = terc-butila

**TCA** = ácido tricloroacético

**TFA** = ácido trifluoroacético

**Thr** = treonina

**TIS** = triisopropilsilano

**Trp** = triptofano

**Val** = valina

**°C** = grau *Celsius*

**μL** = microlitro

**μg** = micrograma

**θ** = letra grega “teta”, elipticidade molar

**ℓ** = caminho óptico da cubeta

## RESUMO

A bradicinina (Bk) é um nonapeptídeo vasodilatador que apresenta regiões com aminoácidos susceptíveis à ação de proteases. Quando metabolizada, a Bk não promove vasodilatação, devido à meia-vida reduzida. O objetivo deste trabalho é analisar a atividade da Bk e de dois análogos na presença de um inibidor de proteases denominado *black-eyed pea trypsin/chymotrypsin* (BTCI). Sistemas contendo BTCI e Bk e seus análogos foram caracterizados estruturalmente na forma de complexos moleculares, por métodos espectroscópicos. As atividades dessas moléculas nas formas livre e de complexos, bem como o efeito na contratilidade em músculo liso de cobaia, foram avaliadas em ensaios colorimétricos *in vitro* e *ex vivo*. Além disso, o efeito do BTCI na potencialização da ação hipotensora da Bk e dos seus análogos foi investigado por meio de ensaios *in vivo* em ratos normotensos. As dimensões moleculares do BTCI na presença dos peptídeos, monitoradas por espalhamento de luz dinâmico, indicou formação de complexos entre estas moléculas. Esse processo foi associado a alterações conformacionais na estrutura do BTCI, monitoradas por espectroscopia de dicroísmo circular distante do UV. Adicionalmente, ensaios enzimáticos mostraram que o BTCI mantém sua atividade inibitória contra proteases na presença dos peptídeos e impede a degradação de Bk e seus análogos por estas proteases. Os ensaios em íleo de cobaia demonstraram que Bk e seus análogos apresentam atividade na contração do músculo liso, que é mantida quando adicionados BTCI e as proteases. Quando o BTCI foi testado *in vivo* em ratos Wistar, associado à Bk e aos análogos, diminuição da resistência vascular e, conseqüentemente, da hipotensão, foram observadas, além da vasodilatação renal e aórtica, principalmente quando complexado com a Bk e a Bk<sub>2</sub>. O presente estudo mostrou a inibição de proteases pelo BTCI na presença de Bk e seus análogos e indica este inibidor como uma ferramenta promissora para o aumento dos efeitos da Bk que visem o controle da hipertensão. Além disso, foi mostrado que os análogos de Bk podem ser utilizados como estratégia para o desenvolvimento de um sistema hipotensor de ação prolongada.

**Palavras-chave:** Inibidor Bowman-Birk, bradicinina, *Vigna unguiculata*, estrutura da proteína, atividade hipotensora.

## ABSTRACT

Bradykinin (Bk) is a vasodilator nonapeptide presenting amino acid residues susceptible to proteases cleavage. Bk does not promote vasodilation when metabolized due its reduced half-life in this condition. The aim of this study was to analyze the activity of Bk and two analogs in the presence of the protease inhibitor named black-eyed pea trypsin proteases/chymotrypsin, BTCI. The BTCI, Bk and its analogues were characterized by spectroscopic methods in free and complexes forms. *Ex vivo* assays using guinea pig ileum were carried out to monitor the activity of the molecules in solution. Furthermore, the potentiation of the hypotensive action of Bk and its analogues, in the presence of BTCI, was investigated in normotensive rats. The hydrodynamic diameters of BTCI in the presence of peptides, monitored by dynamic light scattering, indicated the formation of complexes between these molecules. It was associated with conformational changes of BTCI, indicated by far-UV circular dichroism spectroscopy. Additionally, enzymatic assays showed that BTCI retains its inhibitory activity against proteases in the presence of these peptides, inhibiting their proteolytic degradation. Tests on guinea pig ileum demonstrated that BK and its analogues exhibit activity on the smooth muscle in the absence and presence of BTCI. When BTCI was tested *in vivo* on Wistar rats, in the presence of Bk and its analogues, induced a decrease in vascular resistance and, consequently, hypotension, as well as renal and aortic vasodilation, mainly when in complex with Bk and Bk<sub>2</sub>. This study indicates BTCI as a promising tool for increasing the effects of Bk aiming hypertension control. Furthermore, it shows that BK analogues are good strategies for the development of a system for prolonged hypotensive action.

**Keywords:** Bowman-Birk inhibitor, bradykinin, *Vigna unguiculata*, protein structure, hypotensive activity

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b>	i
<b>AGRADECIMENTOS</b>	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iv
<b>LISTA DE TABELAS</b>	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	x
<b>RESUMO</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>SUMÁRIO</b>	xvii
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b>	1
<i>Referências Bibliográficas</i>	4
<b>INTRODUÇÃO</b>	6
<b>Homeostasia e Pressão Arterial Sistêmica (PAS)</b>	6
<i>Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona- SRAA</i>	6
<i>Sistema Calicreína-Cinina</i>	8
<u><i>Metabolismo de Bradicinina- Bk</i></u>	11
<u><i>Serinoproteases</i></u>	13
<b>Inibidores de Serinoproteases</b>	15
<i>Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor – BTCl</i>	16
<u><i>BTCl como agente natriurético</i></u>	20
<i>Referências Bibliográficas</i>	22
<b>OBJETIVOS</b>	27
<i>Objetivo Geral</i>	27

<i>Objetivos Específicos</i>	27
Organograma: Estratégias experimentais	29
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
<b>Obtenção das Substâncias Bioativas</b>	30
<i>Obtenção de Bk e análogos</i>	30
<u><i>Síntese dos análogos de Bk- Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub></i></u>	31
<u><i>Síntese de Bk</i></u>	33
<u><i>Purificação de Bk e análogos</i></u>	35
<i>Obtenção do BTCl a partir de sementes de Vigna unguiculata</i>	36
<u><i>Produção do Extrato Bruto proteico de sementes de V. unguiculata e purificação do BTCl</i></u>	36
<u><i>Avaliação da Pureza do BTCl e dos peptídeos</i></u>	37
<u><i>Quantificação do BTCl e de Bk e análogos</i></u>	38
<b>Análise Estrutural das Moléculas Bioativas</b>	38
<i>Monitoramento por Fluorescência Estática</i>	38
<u><i>Estrutura das serinoproteases na presença de Bk e dos análogos</i></u>	39
<u><i>Modificações estruturais do BTCl na presença de Bk e dos análogos</i></u>	40
<i>Monitoramento por Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD)</i>	41
<u><i>Dimensões moleculares do BTCl na presença de Bk e dos análogos</i></u>	41
<i>Monitoramento por Dicroísmo Circular</i>	42
<u><i>Estrutura secundária do BTCl na presença de Bk e dos análogos</i></u>	42
<b>Análise Funcional das Moléculas Bioativas</b>	43
<i>Ensaio in vitro da atividade de proteases sobre a Bk e análogos</i>	44
<i>Ensaio in vitro da atividade do BTCl na presença de Bk e análogos</i>	45
<i>Ensaio ex vivo da atividade de Bk e análogos</i>	46

<i>Ensaio in vivo da atividade de Bk e análogos</i>	47
<i>Referências Bibliográficas</i>	50
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	53
<b>Seção I. Modulação da ação hipotensora da bradicinina e de análogos de bradicinina por serinoproteases</b>	53
<i>Obtenção de Bk, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub></i>	53
<i>Análise estrutural e funcional de serinoproteases sobre o metabolismo de Bk e dos análogos</i>	55
<i>Análise da ação vasoconstritora de Bk e dos análogos sobre músculo liso</i>	61
<i>Análise da relação entre a atividade e a estrutura de Bk e dos análogos</i>	64
<b>Conclusões</b>	66
<i>Referências Bibliográficas</i>	66
<b>Seção II. Análise da ação de bradicinina e peptídeos análogos modulada pelo inibidor de serinoproteases BTCI</b>	68
<i>Análise da tendência de complexação entre o BTCI e Bk e análogos em solução</i>	68
<i>Análise da estrutura do BTCI após complexação com Bk e análogos</i>	72
<i>Alterações conformacionais do BTCI com Bk e análogos</i>	74
<i>Análise da atividade do BTCI com Bk e análogos</i>	79
<i>Análise da ação de Bk e análogos sobre o músculo liso com BTCI</i>	81
<i>Análise da ação cardiovascular e renal do BTCI com Bk e análogos</i>	83
<b>Conclusões</b>	87
<i>Referências Bibliográficas</i>	88
<b>ANEXOS</b>	

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em sistemas biológicos, em geral, proteases podem ser inativadas por degradação proteolítica e por ação de inibidores, que bloqueiam o sítio catalítico, participando da regulação das atividades proteolíticas dessas moléculas (Lakowicz e Kato, 1980). Inibidores de proteases são amplamente distribuídos na natureza e aqueles encontrados em plantas, pertencem a famílias de proteínas que são utilizadas para a defesa contra insetos e microrganismos e também como proteínas de reserva (Ikenaka e Norioka, 1986).

Estes inibidores apresentam potencial para serem aplicados na obtenção de plantas geneticamente modificadas e em aplicações biomédicas, considerando sua ação contra microrganismos e insetos e suas propriedades anticarcinogênicas (Joanitti, Freitas e Silva, 2006). Entre os vários tipos de inibidores de serinoproteases, alguns dos mais estudados são aqueles pertencentes à família Bowman-Birk (Laskowski e Qasim, 2000; De Leo et al, 2002).

Os inibidores da família *Bowman-Birk* (BBI), à qual pertence o BTCl (*black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor*), objeto de estudo deste trabalho, têm sido descritos como agentes supressores de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) em diversos órgãos e tecidos como mama, cólon, fígado, pulmão, esôfago, epitélio oral e em células de origem hematopoiéticas e do tecido epitelial e conjuntivo (Kennedy, 1998; Deryugina et al, 2002). O BTCl tem sido alvo de estudos biofísicos estruturais há mais de 40 anos no Laboratório de Biofísica Estrutural da Universidade de Brasília-UnB, consistindo em uma linha de pesquisa iniciada pelo Prof. Dr. Manuel Matheus Ventura e em andamento com a liderança da Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas. Este inibidor constitui alvo de desenvolvimento biotecnológico em diversas áreas, tendo sido caracterizado como agente anticarcinogênico de

câncer da mama (Joanitti, Azevedo e Freitas, 2010) e com ação inibitória sobre o desenvolvimento de *Anthonomus grandis* (praga do algodoeiro) (Franco et al, 2003). O BTCI promove alterações morfológicas lesivas em larvas e em inseto adulto da praga do algodoeiro podendo também ser utilizado como importante estratégia no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de pragas (Franco et al, 2003).

O BTCI foi objeto de estudo de um trabalho relacionado direta e indiretamente com a regulação da homeostase de fluídos e eletrólitos, tendo sido o primeiro inibidor BBI reportado apresentando efeitos na natriurese em modelo de rins de rato isolados e perfundidos (Carvalho et al, 2008). Esse trabalho foi um dos fatores motivadores da presente tese, por apresentar relação, mesmo que indireta, com os objetivos aqui propostos, conforme apresentado na seção de objetivos e justificativa. Neste trabalho reportado por Carvalho e colaboradores, os autores mostraram que o BTCI potencializa a ação do peptídeo hipotensor, a guanilina, além de apresentar efeito diretamente no processo de filtração glomerular, em modelos renais de ratos perfundidos. Isto pode estar diretamente relacionado à estrutura do BTCI por apresentar dois sítios reativos em alças  $\beta$  que interagem, simultaneamente e independentemente, inibindo a tripsina (sítio reativo Lys26) e a quimotripsina (sítio reativo Phe43) (Freitas et al, 1997; Barbosa et al, 2007).

Os dados apresentados sugerem que o BTCI pode inibir *in vivo* a degradação de alguns peptídeos ativos como a guanilina, um indutor da natriurese que rapidamente é inativado no sangue, por enzimas do tipo quimotripsina.

Similarmente à guanilina, a Bk é um peptídeo hipotensor que quando liberado na corrente sanguínea é rapidamente degradado por serinoproteases (Uchegbu, 1999). Em uma dissertação de mestrado do programa de Pós-graduação em Biologia

Animal da Universidade de Brasília, desenvolvida na EMBRAPA- Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob a orientação do Dr. Luciano Paulino Silva, diversos análogos de Bk foram identificados a partir da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa* encontrados na região da Mata Atlântica e na Floresta Amazônica (Mundim, 2008). Em parceria dos Professores Dra. Sonia Maria de Freitas, do Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Brasília e do Professor Dr. Luciano P. Silva, do Laboratório de Espectrometria de Massa da EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, a sequência dos análogos de Bk foi disponibilizada e os análogos utilizados para o presente estudo foram sintetizados e purificados (Tabela 1).

**Tabela 1. Sequência de aminoácidos da bradicinina e análogos**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	M.M. (Da)
<b>Bk</b>	Bradicinina	R	P	P	G	F	S	P	F	R	---	---	1060,7
<b>Bk<sub>1</sub></b>	Val,[T] <sup>6</sup> -bradicinil-Val,Asp	V	P	P	G	F	T	P	F	R	V	D	1231,7
<b>Bk<sub>2</sub></b>	Val,[T] <sup>6</sup> -bradicinil-Glu,Ser	V	P	P	G	F	T	P	F	R	Q	S	1232,7

Neste sentido, este trabalho consistiu em verificar os possíveis efeitos do BTCl por meio de análises *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, associado aos análogos de Bk sobre músculo liso isolado de cobaia (*Cavia porcellus*) e fisiologia cardiovascular. Além disso, alterações estruturais do BTCl foram monitoradas, visto que o trabalho envolveu diversas moléculas bioativas, como os análogos de Bk, BTCl e as serinoproteases tripsina e quimotripsina. Os resultados e a discussão dos resultados dessa tese foram desmembrados e serão apresentados em duas seções distintas. A primeira seção apresenta o estudo estrutural da Bk e seus análogos com as serinoproteases, além da atividade destas biomoléculas. A segunda seção envolve o estudo estrutural e a atividade do BTCl após a adição ao sistema contendo Bk e

análogos e as serinoproteases. Anteriormente a estas seções, são apresentadas as seções de Introdução e Material e Métodos.

### *Referências Bibliográficas*

- Barbosa, J. A.; Silva, L.P.; Teles, R.C.; Esteves, G.F.; et al. Crystal structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical Journal*, v. 92, p. 1638–1650, 2007.
- Carvalho, A. F.; Santos-Neto, M.S.; Monteiro, H.S.A.; et al. BTC1 enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, p. 157-162, 2008.
- De Leo F.; Volpicella, M.; Licciulli, F.; Liuni, S.; et al. PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, vol.: 1; 30(1): 347-8, 2002.
- Deryugina, E. I.; Ratnikov, B. I.; Strongin, A. Y. Prinomastat, a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases, has a complex effect on migration of breast carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, v. 104, p. 533 – 541, 2003.
- Franco, O. L.; Santos, R.C.; Batista, J.A.N.; Mendes, et al. “Effects of black-eyed pea trypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomous grandis*”, *Phytochemistry*, v. 63, p. 343–349, 2003.

- Freitas, S. M. de.; Mello, L. V.de.; Silva, M, C, da.; Vriend, G.; et al. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. *FEBS Letters*, v. 409, p. 121-127, 1997.
- Joanitti GA, Freitas SM, Silva LP (2006). Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. *Current Enzyme Inhibition*, 2(3): 199-217.
- Kennedy, A. R. The Bowman–Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, p. 1406–1410, 1998.
- Ikenaka, T. & Norioka, S. (1986) in *Proteinase inhibitors* (Barrett, A. J. & Salvesen, G., eds) pp. 361–374, Elsevier, Amsterdam .
- Joanitti, G. A.; Azevedo, R. B.; Freitas, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer letters*, v. 293, n. 1, p. 73-81, 2010.
- Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. *Springer*. Second edition, pp. 698, 2004.
- Mundin N. Prospecção de Bradicininas de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade de Brasília- UnB, 2008.
- Uchegbu, I. F. Parenteral drug delivery: 1. *Pharmaceutical Journal*, vol. 263, n. 7060, pp. 309–318, 1999.

## INTRODUÇÃO

### **Homeostasia e Pressão Arterial Sistêmica (PAS)**

As doenças cardiovasculares representam aproximadamente 65% dos óbitos no Brasil entre adultos de 30 a 69 anos (Instituto do Coração do Hospital das Clínicas - INCOR, 2012). A hipertensão é um dos grandes fatores de risco para o derrame cerebral, que é uma das principais causas de morte no Brasil. Existem cerca de 600 milhões de hipertensos em todo o mundo. A estimativa de prevalência de hipertensão no Brasil é de um quarto da população.

A pressão arterial sistêmica (PAS) é dependente de sistemas fisiológicos endógenos que interferem no volume sanguíneo, na resistência e na capacidade dos vasos sanguíneos. O controle da PAS está relacionado ao equilíbrio de integração entre o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) e o Sistema Caliceína-Cinina (Simões e Silva, 2006). Este equilíbrio ocorre por meio da liberação de fatores a partir destes sistemas, que promovem o aumento ou a diminuição da PAS, como a angiotensina II e a bradicinina, respectivamente (Ver esquema representado em anexo).

#### *Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona- SRAA*

A via do SRAA consiste de uma cascata de reações que resultam em um agente vasoconstritor, o angiotensinogênio II. Em casos de redução de concentrações de sódio nos rins e no coração, hipovolemia e/ou hipotensão, uma enzima glicoproteolítica, renina, é liberada no sangue a partir das células justaglomerulares das arteríolas aferentes dos rins. A renina é formada a partir da hidrólise da pro-renina por enzimas tipo tripsina, como a caliceína. A pro-renina apresenta 43 resíduos de aminoácidos deixando inacessível o sítio ativo da renina. Após a remoção deste

fragmento por ação das caliceínas, a renina torna-se ativa (Campbell, 2003). A renina é uma angiotensinogenase que cliva a ligação entre os resíduos de leucina e valina da porção N-terminal do angiotensinogênio circulante e forma angiotensina I (Figura 1).

O angiotensinogênio quando degradado pela renina, tem sua estrutura primária reduzida a um decapeptídeo, formando a angiotensina I. Esta sofre rapidamente remoção dos resíduos His<sup>9</sup> e Leu<sup>10</sup> sendo convertida a angiotensina II por ação das Enzimas Conversoras de Angiotensina (ECA) (Griendling et al, 1993).

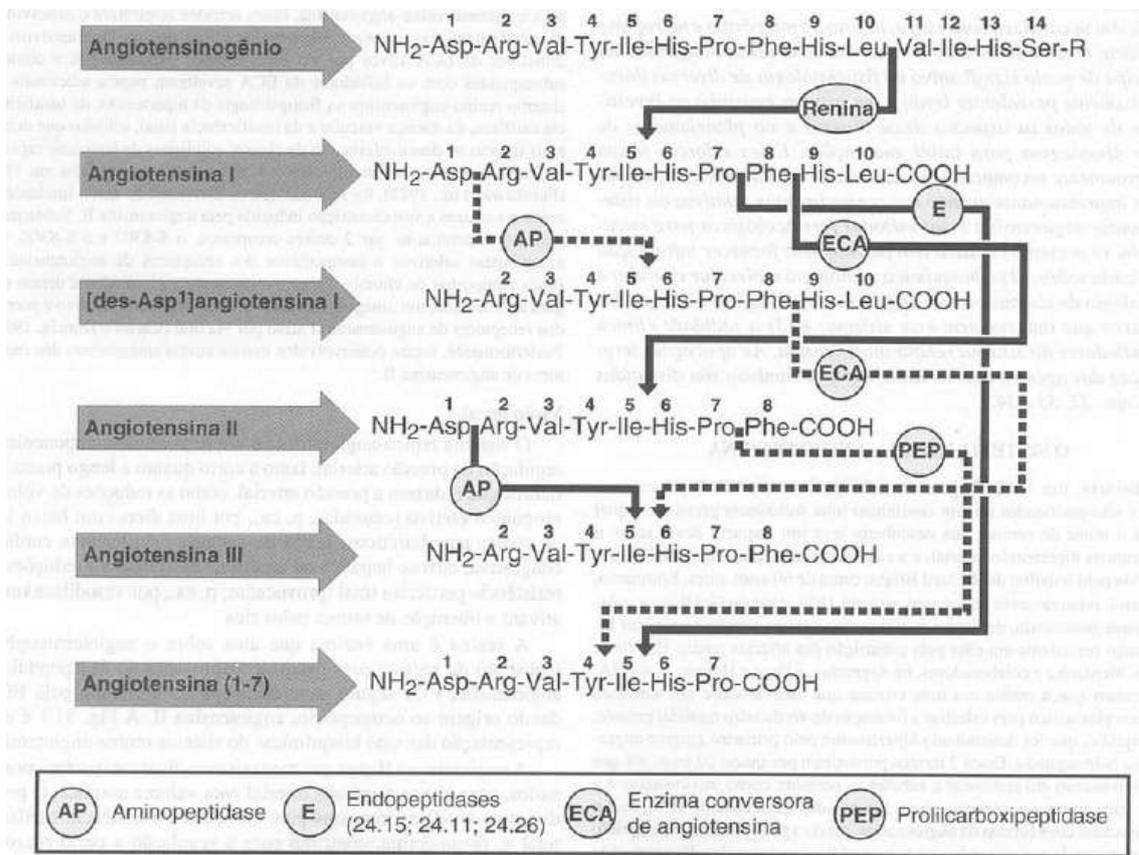


Figura 1. Formação de angiotensina II a partir da ação do sistema renina-angiotensina. As setas sólidas representam reações convencionais e as setas tracejadas as reações alternativas não convencionais. Fonte: Goodman e Gilman, 2005.

A angiotensina II age predominantemente em receptores angiotensinérgicos I ( $AT_1$ ) promovendo contração arteriolar por ativação da fosfolipase C e consequente aumento celular de adenosina 5-monofosfato cíclico (cAMP) (Levinsky, 1979; Simões e Silva, 2006).

Trabalhos anteriores mostraram aumento da concentração de renina nos rins em pacientes tratados com inibidores da ECA como captopril e enalapril (Levinsky, 1979). Estes inibidores, além de impedirem a formação do peptídeo vasoconstritor, impedem a retenção de eletrólitos e de água por inibição da excreção de aldosterona e vasopressina. O uso contínuo destes medicamentos leva à resposta positiva na produção de renina. Sendo a pro-renina o precursor e indutor de enzimas tipo tripsina, inibidores de serinoproteases podem impedir o desbloqueio do sítio catalítico da pro-renina. Os inibidores de serinoproteases podem ser fortes candidatos à terapêutica por apresentarem a característica de se ligar às enzimas responsáveis pela ativação da renina. Isto impede a formação da angiotensina II, evitando sua ação vasoconstritora.

Além disto, serinoproteases são encontradas tanto em organismos simples quanto nos mais complexos. A tríade catalítica destas enzimas cliva ligações próximas aos resíduos de aminoácidos aromáticos além de arginina e lisina (Hedstrom, 2002; Ross et al, 2003), encontrados também em Bk, uma cinina (Puente e Lopez, 2004). A inibição destas serinoproteases favorece a ação de cininas no organismo como agente hipotensor.

### *Sistema Calicreína-Cinina*

O sistema Calicreína-Cinina foi primeiramente descrito em 1937 por Eugen Werle (Werle, 1937). A cascata de ativação deste sistema ocorre por indutores

fisiológicos ainda não bem esclarecidos. Este é um sistema complexo com diversidade de efeitos fisiológicos mediados por cininas, agentes cardioprotetores e pró-inflamatórios, substâncias originadas a partir da ação de caliceínas.

A existência de caliceína foi detectada nas décadas de 1920 e 1930 por Frey e colaboradores, além de Kraut e Werle quando verificaram que amostras de urina apresentavam uma substância hipotensora. Mais tarde, esta substância foi detectada em outros tecidos com maior concentração no pâncreas, do grego *kallikréas*, daí o nome de caliceína. Em 1937, foi observado que a caliceína gera produtos ativos a partir de uma  $\alpha_2$ -globulina plasmática, o cininogênio. Existem dois tipos de cininogênio: o de baixo peso molecular (LMWK) e o de alto peso molecular (HMWK), sendo primeiramente identificado o produto formado a partir da ação da caliceína tecidual sobre o LMWK, a calidina (Werle, 1937).

O HMWK é um substrato da caliceína plasmática que atua gerando uma substância cujo efeito fisiológico foi identificado em 1949 por Rocha e Silva e colegas. Eles observaram os efeitos de sangue de cachorro contendo veneno de serpente (*Bothrops jararaca*) sobre músculo liso de íleo de porquinhos-da-índia. A partir destes ensaios a ação sobre o músculo liso foi registrada e constataram a presença de uma substância que induzia movimentos de contração no íleo de forma lenta e denominaram esta substância de bradicinina, do grego *bradys*: lento e *kinesis*: movimento. A ação de caliceínas sobre o cininogênio forma as cininas, pertencendo ao grupo caliceína-cininas.

Em 1960, Elliot e colaboradores definiram a estrutura da Bk, a partir desta descoberta, vários análogos foram sintetizados permitindo um progresso na elucidação da relação da estrutura e função das cininas (Elliot, 1963). Estudos substituindo cada resíduo de aminoácido presente na bradicinina permitiram verificar

as alterações funcionais decorrentes das alterações e comparar às ações efetuadas pelo peptídeo original. Além disto, análogos sintetizados a partir do cininogênio, apresentando extensão na porção N-terminal, mostrou que não promoveu diferença nos efeitos biológicos (Stewart, 1968; Cann, 1973). Porém, o alongamento da sequência da Bk na porção C-terminal diminuiu extensivamente sua ação vasodilatadora comprovando a ação do resíduo Arg<sup>9</sup> sobre o receptor (Stewart, 1968).

As cininas agem como autacoides, ou seja, são mediadores da dor, da inflamação, da quimiotaxia e aumentam a permeabilidade dos capilares e são potentes vasodilatadores (Regoli e Barabe, 1980). As concentrações plasmáticas das cininas ainda não estão bem estabelecidas por apresentarem duração efêmera no plasma. Cininases, serionoproteases, como ECA e aminopeptidases são proteases que hidrolisam rapidamente as cininas que ficam disponíveis somente nas concentrações de picomolar ou femtomolar (Levinsky, 1979; Regoli e Barabe, 1980).

As cininas presentes em humanos são a bradiginina (Bk) e a calidina, com um resíduo de lisina a mais na porção N-terminal da estrutura da Bk. A ação das cininas é mediada por receptores do tipo B1 e B2 acoplados à proteína G (Moreau et al, 2005). O B1 é expresso somente em situações de lesão, estando associado à dor crônica. O gene do receptor B2 é expresso constitutivamente e está diretamente envolvido com a ação vasodilatadora da Bk em artérias e arteríolas (Rachid et al, 2004). O receptor B2 tem sido identificado principalmente em células endoteliais e em células musculares lisas (Moreau et al, 2005).

Metabolismo de Bradicinina- Bk

A Bk é um peptídeo constituído de nove resíduos de aminoácidos cuja sequência clássica encontrada em mamíferos, em particular humanos, é Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg, sendo as posições 5-6 e 7-8 clivadas pela ECA, além de apresentar outras regiões favoráveis à ação de proteases (Figura 2). A Bk atua no sistema de controle da PAS otimizando o efeito de fármacos anti-hipertensivos, mediante a ação de inibidores da ECA que limitam a obtenção de angiotensina II, inibindo a vasoconstrição e a degradação da Bk por esta enzima. O pentapeptídeo, resultante da ação da ECA na posição 5-6 da Bk, apresenta ação anticoagulante, cujos efeitos não são mediados por receptores (Kuoppala et al, 2000).

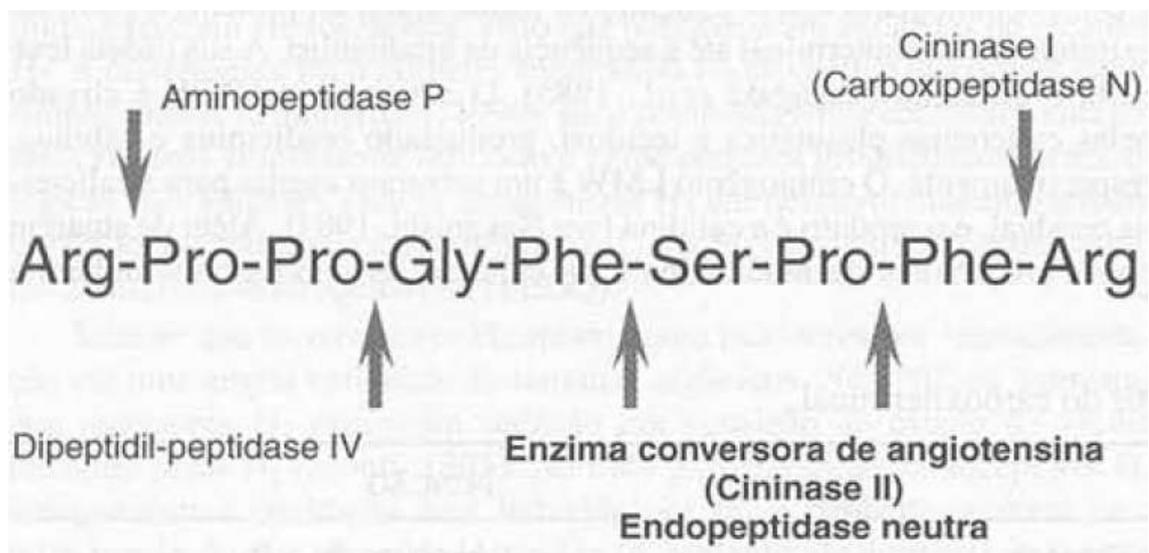


Figura 2. Metabolismo da bradicinina. A Bk é inativada por proteases, que atuam nas posições específicas, como indicado pelas setas. Fonte: Goodman e Gilman, 2005.

Os efeitos fisiológicos da Bk como aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso e vasodilatação, derivam da presença de receptores do tipo B<sub>2</sub> nas células do músculo liso e endoteliais (Couture et al, 2001). Estes receptores

são acoplados à proteína G e a ativação deles geram segundos mensageiros como inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), que aumentam o influxo de cálcio e ativam a fosfolipase C, produzindo prostaglandinas que liberam cAMP no músculo liso vascular, respectivamente. Além disto, a ativação do receptor tipo B2 aumenta diretamente o influxo de cálcio que se complexa com a calmodulina, e ativa a enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta, converte arginina em um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), o óxido nítrico (NO) conversor de guanidina trifosfato (GTP) em guanilina 5-monofosfato cíclico (cGMP), relacionado também com efeito vasodilatador (Moreau et al, 2005). Estes agentes vasodilatadores medeiam a liberação de um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), que apresenta efeito vasodilatador sinérgico ao NO.

A Bk também induz a natriurese por inibir a reabsorção de sódio no ducto coletor cortical. Desta forma, age diminuindo a volemia, o retorno venoso, o débito cardíaco e, conseqüentemente, a pressão arterial. A Bk é degradada entre 80 a 90% na corrente sanguínea e no endotélio por ação de cininases que são classificadas como serinoproteases. A Bk desempenha somente 2/3 de sua atividade potencial devido à presença da ECA (Kuoppala et al, 2000).

A associação da Bk a inibidores de serinoproteases pode manter a integridade e a estabilidade desta substância podendo ser uma estratégia para proteção deste ataque enzimático no sangue (Uchegbu, 1999). Além disto, os análogos da bradicinina estudados neste trabalho, por apresentarem uma extensão C-terminal, podem ser uma estratégia para um efeito hipotensor prolongado. Os resultados observados a partir desta hipótese estão apresentados ao longo do trabalho. A adição dos resíduos negativo como aspartato em Bk<sub>1</sub> e polar como glutamina em Bk<sub>2</sub> pode

retardar a ação das serinoproteases permitindo um efeito prolongado sobre os vasos sanguíneos.

### Serinoproteases

As serinoproteases são assim denominadas por terem sido as primeiras proteases descobertas apresentando um resíduo Ser<sup>195</sup> responsável pelo ataque nucleofílico. Junto ao resíduo Ser<sup>195</sup> foram encontrados os resíduos Asp<sup>102</sup> e His<sup>57</sup> compondo uma tríade no sítio catalítico das proteases. Esta tríade catalítica é responsável pela função biológica que as serinoproteases desempenham incluindo hidrólise de proteínas e participação na homeostase, por clivarem regiões peptídicas após resíduos hidrofóbicos e carregados positivamente (Hedstrom, 2002).

No sítio ativo existem bolsões formando grupos de resíduos de aminoácidos que favorecem a especificidade das serinoproteases. Estes grupos são formados principalmente por meio de ligações de hidrogênio entre os resíduos adjacentes próximos aos resíduos da tríade. Isto é observado para a quimotripsina e tripsina em que a Ser<sup>189</sup>, Gly<sup>216</sup> e Gly<sup>226</sup> e Asp<sup>189</sup>, Gly<sup>216</sup> e Gly<sup>226</sup> formam ambientes hidrofóbico ou negativo o que controla a preferência destas enzimas pela clivagem em regiões próximas a resíduos apolares e positivos, respectivamente.

A hidroxila do resíduo Ser<sup>195</sup> promove a deacilação do carbono do grupo carbonila do substrato peptídico. Esta ação é estabilizada pelo resíduo His<sup>57</sup> que funciona como uma base quando é protonada pelo hidrogênio da hidroxila do resíduo Ser<sup>195</sup> que formando um intermediário tetraédrico (Figura 3 A). His<sup>57</sup> está ligado ao resíduo Asp<sup>102</sup> por ligação de hidrogênio que favorece a estabilidade da reação catalítica (Figura 3 A). A ressonância da dupla ligação induz a saída do grupo amina da ligação peptídica com um hidrogênio a mais devido a desprotonação de

His<sup>57</sup> (Figura 3 B) gerando o intermediário acilenzima (Figura 3 C). Uma molécula de água que participa da camada de solvatação ataca o carbono da carbonila da acilenzima (Figura 3 C) e novamente o resíduo His<sup>57</sup> é protonado enquanto a hidroxila induz deacilação formando um intermediário tetraédrico (Figura 3 D). Isto induz a quebra da ligação entre o resíduo Ser<sup>195</sup> e o substrato e a recuperação do grupo hidroxila de Ser<sup>195</sup> (Figura 3 E) (Hedstrm, 2002).

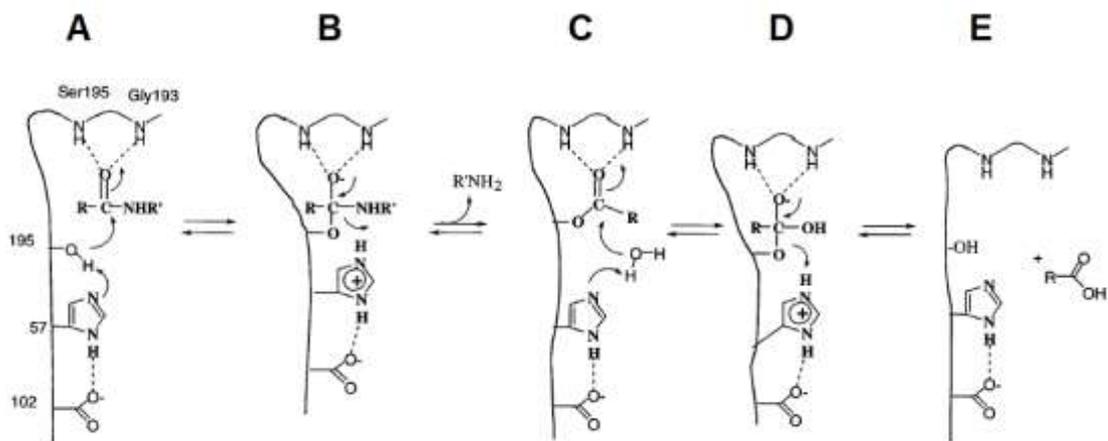


Figura 3. Mecanismo de ação geral (catálise ácida e básica) das serinoproteases. Hedstrom, 2002.

Esta ação catalítica das serinoproteases é regulada por agentes inibidores. Inicialmente, as serinoproteases são secretadas e depois, são liberados os inibidores. As serinoproteases são produtos da clivagem de zimogênios, precursores enzimáticos que maturam na forma das proteases pancreáticas como tripsina, quimotripsina e elastina a partir de tripsinogênio por ação de enteropeptidase, quimotripsinogênio e proelastina, respectivamente. Vários inibidores apresentam estruturas semelhantes aos produtos intermediários, gerados a partir da ação catalítica das serinoproteases, uns mimetizam o intermediário tetraédrico e outros a acilenzima. Os inibidores são

considerados análogos do estado de transição e isto proporciona uma maior afinidade às proteases de forma a garantir uma ligação estável (Madala, Tindall e Fairlie, 2010).

### **Inibidores de Serinoproteases**

Os inibidores de proteases, encontrados em plantas, animais e microorganismos, são importantes para a regulação da atividade de enzimas proteolíticas (Laskowski e Kato, 1980; Bode e Huber, 2000). O interesse pelos inibidores proteicos nas áreas da saúde está associado ao fato de que estas proteínas inibem proteases que controlam funções vitais nos seres vivos, como a replicação viral, controle da fibrinólise, regulação da atividade proteolítica, inibição de enzimas digestivas de insetos predadores de plantas, inibição de enzimas secretadas por leucócitos, entre outras. As propriedades biológicas, químicas, fisiológicas e estruturais destes inibidores têm sido investigadas nos últimos 50 anos. No entanto, até hoje o estudo da relação estrutura-função e o potencial biotecnológico destes inibidores são ainda fontes “inesgotáveis” nas pesquisas básicas e aplicadas nas mais diversas áreas das ciências da vida.

Considerando que estes inibidores de serinoproteases apresentam maior distribuição em plantas, em 1946, o pesquisador Bowman e, posteriormente em 1963, Birk identificaram inibidores de serinoproteases a partir de sementes de plantas da família Leguminosae. Os inibidores da família Bowman-Birk (BBI), à qual pertence o BTCl (*black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor*), têm sido descritos como agentes supressores de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) em diversos órgãos e tecidos (mama, cólon, fígado, pulmão, esôfago, epitélio oral), em células de origem hematopoiéticas e células do tecido epitelial e do tecido conjuntivo (Kennedy, 1998; Deryugina *et al*, 2002). Além disto, tem sido discutido o

papel destes inibidores em enzimas ou moduladores enzimáticos presentes na membrana celular (Carvalho et al., 2008) e com ação específica nos processos de angiogênese (Armstrong et al, 2000; Noel et al, 1998).

O BTCI foi descrito recentemente como um potente inibidor da atividade proteolítica do proteassoma 20S (Souza et al, 2014). Proteassoma é um complexo de enzimas do tipo tripsina, quimotripsina e caspase, responsáveis por reconhecer e degradar proteínas ubiquitinadas. Um aumento da atividade do proteassoma 20S foi registrado em células cancerosas. Tendo isto em vista, Souza et al (2014) estudaram os efeitos inibitórios do BTCI sobre o proteassoma 20S com a finalidade de induzir à disfunção celular e, conseqüentemente, levar células de câncer de mama (MCF-7) à apoptose. Estudos utilizando ensaios *in vitro* e microscopia confocal mostraram que o BTCI atravessa a membrana das células de câncer de mama e forma complexos com o proteassoma citoplasmático e nuclear inibindo sua atividade catalítica o que pode estar relacionado aos efeitos anticarcinogênicos anteriormente descritos.

#### *Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor – BTCI*

O BTCI foi purificado, primeiramente, em 1966 por Ventura e Xavier a partir de sementes de *Vigna unguiculata*, conhecido como feijão-de-corda. O nome deste BBI deve-se às características físicas do feijão, sementes de cor amarelada e um hilo branco com orla de cor mais escura (Figura 4).



Figura 4. Sementes maduras de *Vigna unguiculata* (Joanitti, 2008).

Esse inibidor é uma molécula globular apresentando 83 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 9,1 kDa (Freitas, et al, 1997; Morhy e Ventura, 1987). É estável, devido à presença de sete ligações dissulfeto, apresentando atividade entre as faixas de pH 3 a 10, à temperatura ambiente e perde somente 4% de sua atividade inibitória em temperaturas altas, de até 95°C (Silva et al, 2001). O BTCI apresenta dois subdomínios similares cujos sítios reativos são independentes e posicionados em alças  $\beta$ . Estas alças apresentam nove resíduos de aminoácidos estabilizados por ligações de hidrogênio, sendo a Lys<sup>26</sup> e Phe<sup>53</sup> os sítios reativos para a tripsina e quimotripsina, respectivamente (Figura 5) (Freitas et al, 1997; Barbosa et al, 2007).

A distância entre os sítios reativos contra as serinoproteases (32,5 Å) permite a inibição simultânea das serinoproteases sendo que a formação de um complexo binário como BTCI-tripsina ou BTCI-quiotripsina não induz à alteração conformacional no restante da molécula (Barbosa et al, 2007). A estrutura do BTCI ligado simultaneamente à tripsina e quimotripsina já foi resolvida e depositada no PDB, considerando que é a primeira estrutura do complexo ternário de inibidores BBI com tripsina e quimotripsina, depositada no PDB (Esteves et al, 2007; Código PDB 3RU4).

A interação entre o BTCI e a quimotripsina está representada na figura 6. O arranjo estrutural do BTCI é caracterizado pela presença de resíduos de aminoácidos apolares expostos ao meio. Ensaio espectroscópicos com BTCI mostraram a

presença de uma tirosina e três fenilalaninas expostas ao solvente (Mizuta e Ventura, 1983; Martin e Ventura, 1986; Barbosa et al, 2007). Esta conformação diferenciada pode estar relacionada à propriedade do BTCl de auto-associação.

Imagens topográficas da molécula do BTCl obtidas a partir de análises por microscopia de força atômica (MFA) mostraram que este inibidor apresenta característica globular-elipsoidal de dimensões 0,62–1,21 nm, 3,0–97,4 nm<sup>2</sup> e 7,1–91,4 nm para altura, área e perímetro, respectivamente. Estas formas moleculares rearranjaram-se sobre a superfície de análise (mica) de forma ordenada, porém multimerizada. Foram encontradas formas monoméricas, diméricas, triméricas e hexaméricas. Análises por simulação em *docking* foram feitas para validar as análises por MFA e foram selecionados os arranjos dos multímeros energeticamente favoráveis, com associações de até treze monômeros de BTCl. Este processo de associação dos monômeros do BTCl é ordenado de forma a gerar os multímeros a partir de estruturas diméricas e triméricas e podem ocorrer nos sistemas biológicos favorecendo a ação do inibidor (Silva et al, 2005).

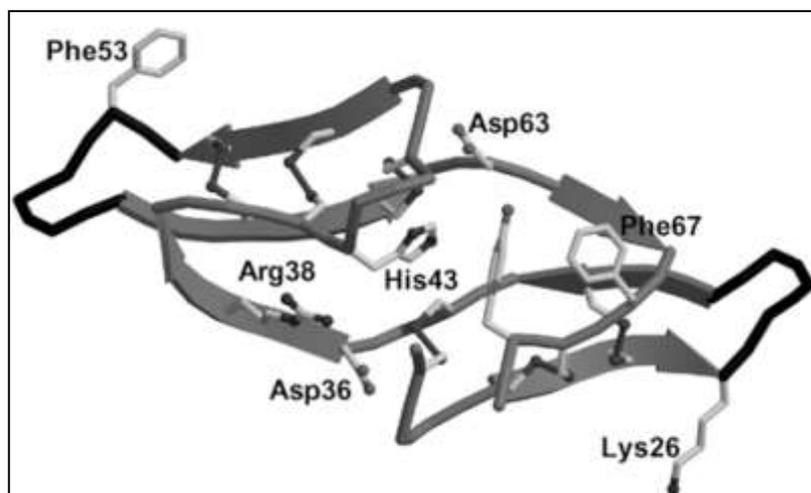


Figura 5. Estrutura tridimensional do BTCl (Barbosa et al, 2007; código no pdb 2G81).

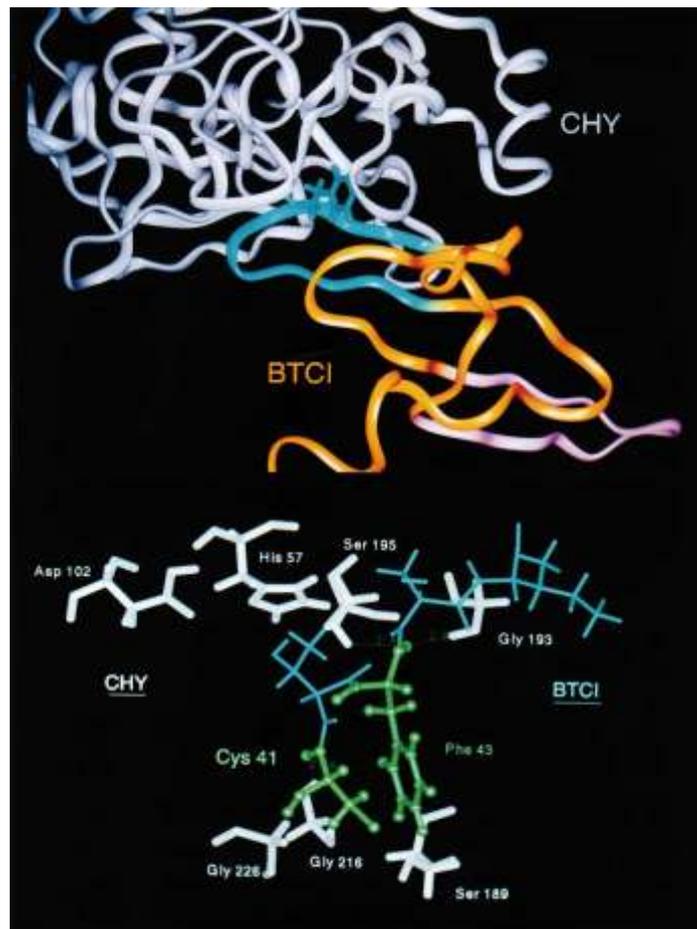


Figura 6. Complexo BTCI-quimotripsina. A primeira figura corresponde à interação entre o BTCI e a quimotripsina em que as cores azul e rosa representam as regiões dos sítios reativos do BTCI. A segunda figura representa os resíduos do BTCI e da quimotripsina envolvidos no processo de interação. (Freitas et al, 1997).

Esse inibidor constitui alvo de desenvolvimento tecnológico em diversas áreas, tendo sido caracterizado como agente anticarcinogênico de câncer da mama além de interferir no desenvolvimento de *Anthonomus grandis* (praga do algodoeiro) (Joanitti, Azevedo e Freitas, 2010; Carvalho et al, 2008).

Mais recentemente, Joanitti e colaboradores (2010) desenvolveram estudos *in vitro* que confirmaram o potencial anticarcinogênico do BTCI sobre células de câncer de mama MCF-7. Os resultados encontrados a partir dos ensaios em células de câncer de mama comprovaram uma redução da viabilidade celular e da proliferação

nas fases S e G2 / M. Além disso, foram observados efeitos citostáticos e citotóxicos como morte das células por apoptose associada a alterações morfológicas expressivas. Foram observadas fragmentação da membrana celular, desorganização citoplasmática, aumento do volume dos lisossomos e desorganização da cromatina em células tumorais tratadas com BTCI. Não foi observada interferência do BTCI na viabilidade de células de mama saudáveis sugerindo, então, o BTCI ser um potente agente anticarcinogênico contra células tumorais sem apresentar efeitos adversos significativos em células normais (Joanitti, Azevedo e Freitas, 2010).

Franco e colaboradores (2003) mostraram que o BTCI causa alterações morfológicas lesivas em larvas e inseto adulto podendo ser utilizado no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de pragas. Nessa pesquisa, os efeitos inibitórios do BTCI sobre enzimas digestórias do intestino de larvas de *Anthonomus grandis* foram testados por meio de uma dieta artificial contendo BTCI a 10 mM, 50 mM e 100 mM. Por meio desse experimento, uma diminuição de peso larval de 54% foi observada, quando utilizado BTCI 100 mM, além de ser detectada 65% de mortalidade dos insetos.

#### *BTCI como agente natriurético*

O BTCI também foi caracterizado como importante inibidor envolvido na potencialização do efeito do peptídeo *guanilina*, na homeostase de fluidos e eletrólitos, por inibição de serinoproteases presentes no sangue, semelhantes à quimotripsina (Carvalho et al, 2008).

A guanilina é um peptídeo endógeno análogo à enterotoxina termoestável (STa) que tem ação sobre receptores acoplados à proteína G com posterior de secreção de cGMP, que atua como indutor da natriurese e kaliurese. A guanilina foi

isolada a partir da porção jejuno do intestino de ratos por Currie e colaboradores em 1992. Greenberg e colegas (1997) observaram que a guanilina é rapidamente inativada *in vitro* por ser hidrolisada por quimotripsina e associaram isto à presença em sua estrutura de resíduos de aminoácidos aromáticos, como fenilalanina e tirosina.

Partindo do conhecimento que o BTCI é um inibidor de serinoproteases, e com o objetivo de analisar se as proteases *chymotrypsin-like* apresentavam relação com o sistema renal, modelos de hipertensão em ratos foram estudados na presença do BTCI e guanilina. Perfusados a partir dos rins de ratos adultos Wistar-Kyoto com peso entre 250-300 g foram coletados e analisados nos ensaios.

Para investigar o efeito do BTCI na homeostase, foram realizados ensaios utilizando somente o BTCI em modelos de hipertensão. Mesmo testado com baixas concentrações (0,3 – 3,0  $\mu\text{M}$ ), o BTCI promoveu aumento na taxa de excreção de sódio e foram observadas as mesmas proporções na taxa de excreção, quando testado nas concentrações 0,3  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  e 3,0  $\mu\text{M}$ . Desta forma, o efeito natriurético induzido pelo BTCI não foi dose-dependente. Entretanto, foram comprovados diferentes efeitos homeostáticos do BTCI dependentes da concentração utilizada nos testes. O BTCI testado a 1,0  $\mu\text{M}$  induziu a diurese e o aumento de calemia e, quando testado na concentração 3,0  $\mu\text{M}$ , o inibidor promoveu aumento na taxa de filtração glomerular.

A descrição destes resultados indicou que a presença do BTCI no perfusado antes da adição da guanilina alterou os efeitos renais monitorados pelos parâmetros citados acima e possibilitou a ação da guanilina (Carvalho et al, 2008). Este trabalho foi o primeiro relato de efeitos renais induzidos por um inibidor Bowman-Birk, com consequente ação no equilíbrio homeostático e foi fundamental para abertura de

outras possibilidades de investigação do efeito do BTCI em sistemas vasculares *in vivo*, que é uma das metas descritas na presente Tese.

### *Referências Bibliográficas*

- Armstrong, W.B.; Wan, X.S.; Kennedy, A.R.; Taylor, T.H.; et al. Development of the Bowman-Birk inhibitor for oral cancer chemoprevention and analysis of immunohistochemical staining intensity with Bowman-Birk inhibitor concentrate treatment. *Laryngoscope*, v. 113, p. 1687–702, 2000.
- Barbosa, J. A.; Silva, L. P.; Teles, R. C.; Esteves, G. F.; et al. Crystal structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical Journal*, v. 92, p. 1638–1650, 2007.
- Birk, Y.; Gertler, A.; Khalef, S. A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochemical Journal*, v. 87, p. 281-284, 1963.
- Bode, W.; Huber, R. Structural basis of the endoprotease - protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1477, p. 241-252, 2000.
- Bowman, D. E. Differentiation of soybean antitryptic factors. Proceedings of the Society for Experimental *Biology and Medicine*, v. 63, p. 547-550, 1946.
- Carvalho, A. F.; Santos-Neto, M. S.; Monteiro, H. S. A.; Freitas, S. M.; et al. BTCI enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, p. 157-162, 2008.
- Campbell, D. J. Renin-Angiotensin Systems: State of the Art The renin–angiotensin and the kallikrein–kinin systems. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, p. 784-791, 2003.

- Couture, R.; Harrison, M.; Vianna, R. M. Cloutier, F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* V. 429, p. 161-76, 2001.
- Deryugina, E. I.; Ratnikov, B. I.; Strongin, A. Y. Prinomastat, a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases, has a complex effect on migration of breast carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, v. 104, p. 533 – 541, 2003.
- Elliot, D. F. Structure of bradykinin. In: Rocha e Silva M. e Euler U. S. von. Bradykinin and vasodilatation polypeptides: first international pharmacological meetin, v. 9, Pergamon, p. 25-8, 1963.
- Esteves, G. F.; Teles, R. C. L.; Cavalcante, N. S.; Neves, D.; et al. Crystallization, data collection and processing of the chymotrypsin–BTCI–trypsin ternary complex . *Acta Crystallographica*, v. 63, p. 1087–1090, 2007.
- Franco, O. L.; Santos, R. C.; Batista, J. A. N; Mendes, A. C. M; et al. Effects of black-eyed pea trypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomous grandis*. *Phytochemistry*, v. 63, pp. 343–349, 2003.
- Freitas, S. M. DE.; Mello, L. V. DE.; Silva, M, C, DA.; et al. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. *FEBS Letters*, v. 409, p. 121-127, 1997.
- Goodman e Gilman, A. As bases farmacológicas da terapêutica. McGrall-Hill, Rio de Janeiro, RJ, 10ª Ed., 2005.
- Greenberg, R. N.; Hill, M.; Crytzer, J.; Krause, W. J.; et al. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin and *Eschericha coli* enterotoxin STA On mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Invest Med.*, v. 45, p. 276-82, 1997.

- Griendling, K.K.; Murphy, T.J.; Alexander, R.W. Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. *Circulation*, v. 87, p. 1816-1828, 1993.
- Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, v. 102, p. 4501-4523, 2002.
- Joanitti, G. A. Efeitos citostáticos e citotóxicos do inibidor de proteases-BTCI- e peptídeos derivados em células de câncer de mama (mcf-7). *Dissertação de Mestrado*. p1-102. Brasília, 2008.
- Joanitti, G. A.; Azevedo, R. B.; Freitas, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer letters*, v. 293, n. 1, p. 73-81, 2010.
- Kennedy, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, p. 1406-1410, 1998.
- Kuoppala, A.; Lindstedt, K. A.; Saarinen, J.; Kovanen, P.T.; et al. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, v. 278, p. 1069-1074, 2000.
- Laskowski, M.; Kato, I. Protein inhibitor of proteinase. *Annu. Rev. Biochem.* v. 49, p. 593-626, 1980.
- Levinsky, N. G. The renal kallikrein-kinin system. *Circulation Research (Heart Association)*, v. 44, p. 441-451, 1979.
- Madala, P. K.; Tyndall, J. D.; Nall, T.; Fairlie, D. P.; "Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites". *Chem Rev*, v. 110 (6): 2010. DOI :10.1021/cr900368a. PMID 20377171.

- Martin, C.O. and Ventura, M.M. Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor of *Vigna unguiculata* Seeds – Involvement of Tyrosyls in its Interaction with Proteases. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, v. 58 (2), p. 297 – 302, 1986.
- Mizuta, K. and Ventura, M.M. State of the Phenylalanine Residues in the Black-Eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, v. 55, p. 129 – 134, 1983.
- Moreau, M. E.; Garbacki, N.; Molinaro, G.; Brown, N. J.; et al. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 99, p. 6 – 38, 2005.
- Morhy, L.; Ventura, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 59, n. 1-2, p. 71, 1987.
- Noël, A.; Gilles, C.; Bajou, K.; Devy, L.; et al. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion & metastasis*, v. 17, n. 5, 1998.
- Puente, X. S.; Lopez-Otin, C. A Genomic Analysis of Rat Proteases and Protease Inhibitors. *Genome Biol*, v. 14, p. 609-622, 2004.
- Regoli, D.; Barabe, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*, v. 32, p.1-46, 1980.
- Rocha e Silva M. Fundamentos da farmacologia e suas aplicações e terapêutica. São Paulo, *Edart*, 1949.
- Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, v. 20, n. 11, p. 3096-3102, 1981.
- Simões e Silva A. C. Pathophysiology of arterial hypertension. *Current Pediatric Reviews*, v. 2, p. 209-223, 2006.

- Silva, L.P., Roberto, S. A. L. J., Bloch, J. C., Freitas, S. M. Stability Of A Black Eyed Pea Trypsin Chymotrypsin Inhibitor (BTCl). *Protein and Peptide Letters*, v. 8, n. 1, p. 33-38, 2001.
- Silva, L. P.; Azevedo, R. B.; Morais, P. C.; Ventura, M. M.; et al. Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. *Proteins*, v. 61, p. 642-648, 2005.
- Souza, LdC.; Camargo, R.; Demasi, M.; Santana, J. M.; et al. Effects of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitor on Purified 20S Proteasome and MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, v. 9(1), 2014. doi:10.1371/journal.pone.0086600.
- Stewart, J. M. Structure-activity relationships in bradykinin analogue. *Fedn Proc*, v. 27(1), p. 63-6, 1968.
- Uchegbu, I. F. Parenteral drug delivery: 1. *Pharmaceutical Journal*, vol. 263, n. 7060, pp. 309–318, 1999.
- Werle, E. Uber die wirkung des kallikreins auf den isolierten darm und uber eine neue darmkontrahierende substanz. *Biochemistry*, v. 289, 217-233, 1937.

## OBJETIVOS

### *Objetivo Geral:*

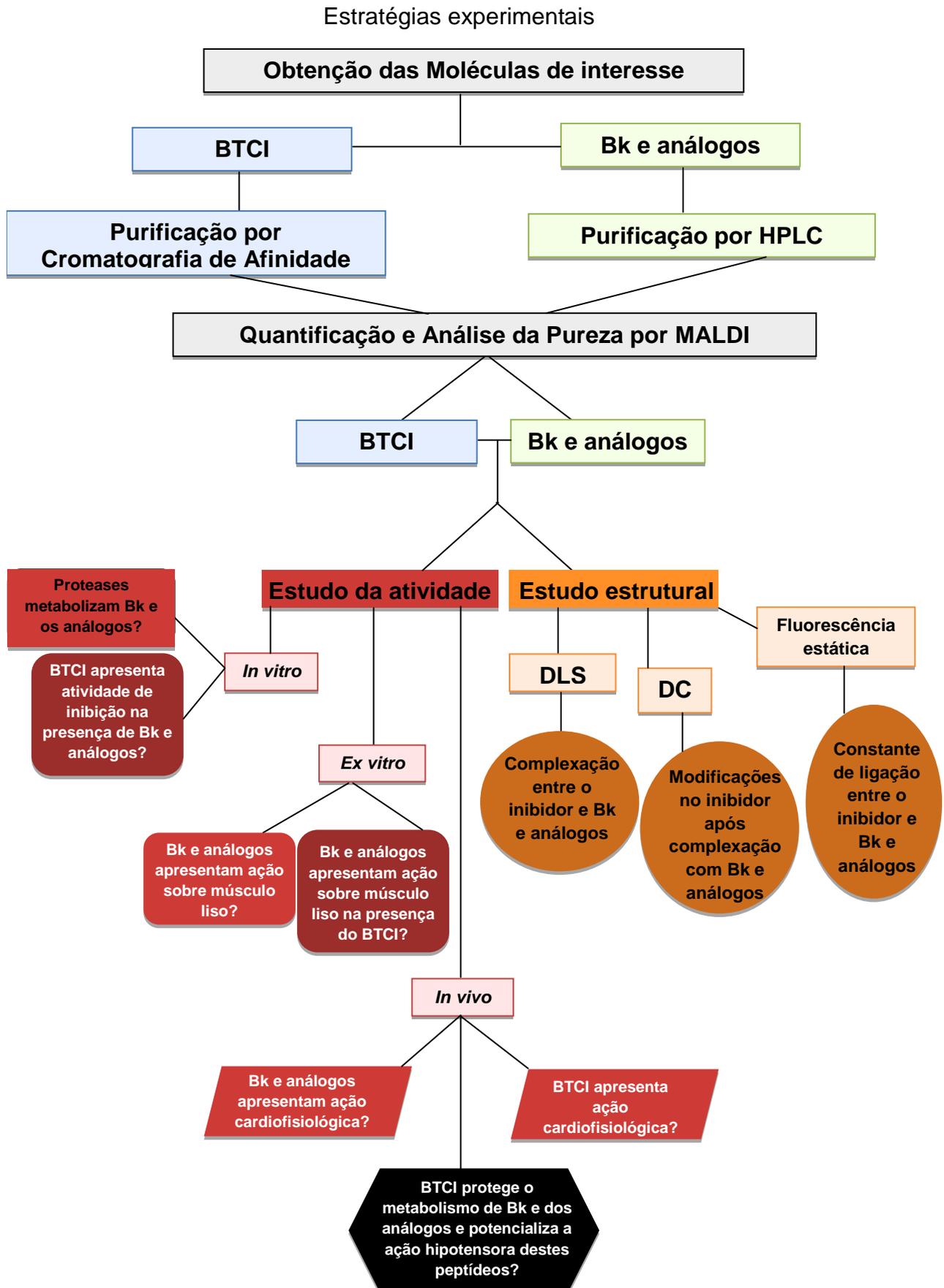
Avaliar a ação protetora do BTCI contra a ação de serinoproteases sobre a Bk e peptídeos análogos, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>, bem como o efeito do BTCI sobre a ação hipotensora *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

### *Objetivos Específicos:*

- Sintetizar e purificar a Bk e seus peptídeos análogos (Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>);
- Avaliar a ação das serinoproteases sobre a Bk e seus análogos por ensaios colorimétricos *in vitro*;
- Monitorar as modificações estruturais das serinoproteases decorrentes do complexo com a Bk e seus análogos por fluorescência estática;
- Monitorar a atividade da Bk e de seus análogos na ausência e presença das serinoproteases;
- Monitorar as modificações estruturais do BTCI na presença de Bk e dos análogos, por fluorescência estática, dicroísmo circular e espalhamento de luz dinâmico;
- Verificar a atividade do BTCI sobre serinoproteases na presença de Bk e análogos por ensaios colorimétricos *in vitro*;
- Monitorar a atividade da Bk e dos análogos na ausência e presença do BTCI em experimentos *ex vivo* em íleo de cobaia
- Monitorar a ação protetora do BTCI contra serinoproteases sobre a ação hipotensora da Bk e dos análogos por métodos *ex vivo* e *in vivo*.

- Avaliar a ação fisiológica cardiovascular do BTCl na forma livre ou associada a Bk e aos análogos em sistema *in vivo*.

## Organograma: Estratégia experimental



## MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram investigadas três moléculas bioativas com funções distintas: a) hipotensão: Bk e peptídeos análogos de Bk; b) inibição (de serinoproteases): *Black-eyed pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor* (BTCl) e c) proteólise: serinoproteases (quimotripsina e tripsina). Para o desenvolvimento do estudo, inicialmente foi necessário obter as moléculas ativas isoladamente, para posteriores análises da estrutura e da atividade das moléculas isoladas e associadas em um mesmo sistema. Para tanto, de forma geral, a metodologia consistiu de três etapas: **3.1. Obtenção das Substâncias Bioativas**, **3.2. Análise Estrutural das Moléculas Bioativas** e **3.3. Análise Funcional das Moléculas Bioativas**. Nas seções I e II referentes aos **Resultados e Discussão**, os dados foram agrupados de acordo com a ordem sequencial das análises dos dados obtidos e não na ordem de **Material e Métodos** descritos.

### Obtenção das Substâncias Bioativas

#### *Obtenção de Bk e análogos*

Peptídeos análogos à Bk foram previamente isolados a partir da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa* espécies *P. tomopterna*, *P. rohdeie* *P. burmeisteri* e identificados segundo Mordin, 2008. Posteriormente, estes peptídeos foram sintetizados manualmente devido à quantidade insuficiente de amostra proveniente da purificação dos mesmos, isolados naturalmente.

A síntese dos peptídeos de interesse foi realizada considerando as sequências: a) RPPGFSPFR, Bk; b) VPPGFTPFRVD, análogo 01 de Bk, denominado

Bk<sub>1</sub> e c) VPPGFTPFRQS, análogo 02 de Bk, denominado Bk<sub>2</sub>. O processo de síntese foi iniciado a partir da região C-terminal, manualmente e em fase sólida Fmoc/t-butila (9-fluorenilmetoxicarbonila). Resumidamente, o processo consistiu das etapas a seguir: 1) desproteção do grupamento amino de cada derivado de aminoácido para disponibilizar o mesmo para ligação peptídica; 2) lavagem para retirada dos produtos secundários; 3) acoplamento do derivado de aminoácido da sequência; 4) lavagem e, após conclusão da síntese da estrutura do peptídeo de interesse, 5) clivagem da estrutura primária do peptídeo da resina. Essas etapas serão detalhadas abaixo, caso a caso.

#### Síntese dos análogos de Bk- Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>

Os análogos foram sintetizados utilizando a estratégia de síntese manual em fase sólida Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila)/t-butila em suporte sólido, polímero extremamente estável e insolúvel em bases orgânicas (Merrifield, 1995; Fields e Noble, 1990). O suporte sólido utilizado para a síntese de Bk<sub>1</sub> foi Fmoc-Asp(OtBu) Wang Resin/ Peptides International, na concentração de 0,2 mmol.g<sup>-1</sup> e Fmoc-Ser (tBu) Wang Resin para Bk<sub>2</sub>. O grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila) é um protetor base-lábil do grupo amino dos resíduos de aminoácidos que, quando removido, deixa o grupo amino do aminoácido disponível para a ligação peptídica com o próximo derivado de aminoácido da sequência a ser acoplado.

O primeiro derivado de aminoácido da porção C-terminal, na concentração de 0,6 mmol, foi submetido à desproteção do grupamento amino por Fmoc, utilizando 4-metil-piperidina 20% em dimetilformamida (DMF) 75%, seguindo duas etapas de lavagem sob agitação durante quinze minutos.

A etapa de acoplamento foi seguida da adição de  $0,6 \text{ mmol.g}^{-1}$  de hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1-1-3-3-tetrametilurônio (HBTU);  $0,78 \text{ mmol.g}^{-1}$  de N, N-diisopropiletilamina (DIPEA) e 2 mL de DMF, sob agitação por 1 hora e 30 minutos.

Entre cada etapa de desproteção e acoplamento do respectivo derivado de aminoácido, a resina foi lavada com isopropanol e DMF por quatro vezes alternadamente e, por último, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de diclorometano (DCM) para preservar a sequência ligada à resina. Além disso, as etapas de desproteção e acoplamento do respectivo derivado de aminoácido foi monitorada por meio do Teste *Kaiser* (Kaiser et al, 1970). Esse teste confirma a presença de grupamentos amino livres dos aminoácidos ligados à resina, ou seja, confirma a remoção do grupo Fmoc, liberando um produto de coloração azul. Quando um derivado de aminoácido se liga ao grupamento amino livre, não se observa a coloração azul, ficando então branco ou amarelado. Esse resultado permite confirmar o acoplamento do derivado de aminoácido da sequência. Para isso, são utilizadas três soluções: 1  $\mu\text{L}$  da solução 01 (KCN 0,001 M em piridina), 2  $\mu\text{L}$  da solução 02 (fenol 80% em etanol) e 1  $\mu\text{L}$  da solução 03 (ninhidrina 5% em etanol). Essas foram adicionadas a aproximadamente 0,01 mg de resina, para evitar perda de material, em um tubo de ensaio. A coloração é observada após 3 minutos a  $110^\circ\text{C}$ . Em casos que os resultados do teste de *Kaiser* apresentavam-se não conclusivos, as etapas foram repetidas até que fosse observado o esperado. Este procedimento foi repetido até completar a cadeia peptídica de interesse.

Ao término da síntese peptídica, o conteúdo foi pesado e submetido à clivagem da resina. A ligação entre o grupamento C-terminal do primeiro resíduo à resina e os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos são ácido-lábeis,

portanto foram adicionados TFA 95% e TIS (triisopropilsilano) 2,5% e água destilada 2,5%, sob agitação por 1 hora e 30 minutos. O TFA foi removido por evaporação em nitrogênio gasoso por 30 minutos. A amostra foi precipitada utilizando 40 mL de éter diisopropílico e, posteriormente, congelada em  $N_2(l)$ . O éter diisopropílico retira os sequestradores de carbocátions e o excesso de grupos protetores da amostra. O precipitado foi lavado utilizando ACN:água (1:1; v:v) para extrair o peptídeo da resina. Após essa etapa, a resina foi descartada e o peptídeo extraído, liofilizado até secagem completa. O extrato bruto contendo o peptídeo foi armazenado até o momento da purificação.

### Síntese de Bk

A parte inicial da síntese de Bk foi realizada de maneira diferente dos demais peptídeos, devido este peptídeo apresentar necessidade de acoplar o primeiro derivado de aminoácido à resina por estar em falta no laboratório e o prazo de entrega atrasaria a pesquisa. Portanto, foi utilizado o método de esterificação da resina hidroxil-funcionalizada para o acoplamento do primeiro derivado de aminoácido, utilizando o Método Anidrido Simétrico (Chan e White, 2000). Este método consiste em preparar a resina com DCM seco  $3 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$  (30 mL). Esta resina é adicionada ao anidrido simétrico, formado da reação entre o derivado de aminoácido e DIC) 5 mmol. Esta solução resulta na ligação de esterificação entre o grupamento OH da resina com o primeiro derivado de aminoácido, utilizando dimetilaminopiridina (DMAP) 0,1 mmol.

Previamente, foram adicionados DCM  $3 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$  (seco) em três volumes da resina Wang Resin/ Peptides International 1,0 mmol, em um tubo Falcon de 15 mL, sob agitação por 30 minutos. Esta etapa é importante para remover bolhas de ar

e formar uma suspensão de resina. O DCM foi removido a vácuo e novamente foram adicionados 3 volumes de DCM, sob agitação por 30 minutos. O DCM foi removido a vácuo e a resina foi lavada sucessivamente com DMF, DCM, DMF e DCM e drenada a vácuo por 10 minutos. Dessa forma a resina foi armazenada até o momento do uso.

DCM seco ( $3 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ) foi adicionado ao derivado de aminoácido Fmoc-Arg(Pbf)-OH 10 mmol para dissolver o resíduo em um balão de fundo redondo de 125 mL equipado com um agitador magnético. Em seguida, foram adicionados 780  $\mu\text{L}$  de DIC 5 mmol para a formação do anidrido simétrico do aminoácido. A mistura foi mantida por 20 min a  $0^\circ\text{C}$ , com um tubo de  $\text{CaCl}_2$  acoplado à boca do balão. Um volume mínimo de DMF foi adicionado sob agitação, por 10 minutos, para dissolver o precipitado gelatinoso formado. O DCM foi removido por evaporação, sob pressão reduzida, utilizando um evaporador rotatório.

A massa da resina correspondente a 1,0 mmol de grupos OH, previamente inchada e lavada, foi transferida para o balão de fundo redondo de 125 mL contendo o anidrido simétrico. Ao balão, foram adicionados DCM seco em volume suficiente para solvatar completamente a resina e 0,1 mmol de DMAP (dimetilaminopiridina). O tubo de  $\text{CaCl}_2$  foi acoplado sobre a boca do balão e a mistura foi submetida a agitação à temperatura ambiente por 2 horas. Após essa etapa, foi realizado o processo de lavagem da resina DMF, sob vácuo, recolhendo-a em funil de placa porosa, com DMF, DCM, 2-propanol e drenada a vácuo por 10 minutos.

A reação de acoplamento do anidrido simétrico do Fmoc-Arg(Pbf)-OH foi repetida mais uma vez, para garantir o acoplamento, devido ao impedimento espacial proporcionado pelo arranjo tridimensional do resíduo de arginina C-terminal. O acoplamento do primeiro resíduo foi estimado em triplicata, pela medida de absorbância a 290 nm do produto da reação, partindo de 3 mg de resina em tubos

tipo Falcon com 3 mL de 4-metil-piperidina 20% em DMF, sob agitação por 5 minutos. Foi feito o branco com a solução de 4-metil-piperidina 20% em DMF, sem a resina. A média dos três valores de absorbância foi calculada e a concentração foi estimada utilizando a equação 1, considerando a cubeta de 1 cm de trajeto óptico e  $\epsilon=5253 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ :

$$\text{Equação (1)} \quad C_{(mol/l)} = Abs / \epsilon$$

As demais desproteções, acoplamentos e a clivagem final foram desenvolvidos da forma convencional para a síntese de peptídeos em fase sólida, como descrito acima. O peptídeo extraído, liofilizado até secagem completa, foi armazenado até o momento da purificação.

#### Purificação de Bk e análogos

Os peptídeos sintetizados foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) em fase reversa (do inglês *Reverse Phase* - RP) (Shimadzu Corp., Japan) em uma coluna semipreparativa 218TP510, previamente lavada com duas vezes o volume de acetonitrila e TFA 0,1% (solvente B) e equilibrada com água ultrapura e TFA 0,1% (solvente A). Dois mg do peptídeo bruto foram dissolvidos em 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura contendo TFA 0,1% e aplicados na coluna utilizando um *loop* de 200  $\mu\text{L}$ . As frações foram coletadas a partir de um gradiente linear de acetonitrila (0 a 95%) de 5 a 50 minutos, sob fluxo de 2,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O conteúdo de cada fração, monitorado nos comprimentos de onda de detecção das ligações peptídicas (216 nm), foi coletado manualmente e liofilizado. Cada amostra coletada foi analisada quanto à massa molecular, identidade e pureza conforme descrito abaixo.

### *Obtenção do BTCI a partir de sementes de Vigna unguiculata*

As etapas descritas abaixo para obtenção do inibidor de serinoproteases isolado de *Vigna unguiculata* foram realizadas utilizando o protocolo descrito por Ventura e colaboradores em 1966.

### *Produção do Extrato Bruto proteico de sementes de V. unguiculata e purificação do BTCI*

O BTCI foi isolado e purificado de sementes de feijão de corda da espécie *Vigna unguiculata* (Ventura et al, 1966). Essas sementes foram coletadas da Estação de Biologia Experimental da Universidade de Brasília, secas e trituradas até completa formação de pó.

Quinhentos gramas do feijão foram utilizados para extração de proteínas, que consistiu de incubação desse material em 2 L de água destilada e fenilmetanosulfonilfluorido (PMSF) 200 mM, um inibidor de protease sintético a 4°C por 12 horas, seguido da precipitação das proteínas com TCA (ácido tricloroacético PA – C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich, USA) a 2,5% (v/v), e com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50% (m/v). O material foi centrifugado a 12000 g por 40 minutos a 4°C e o precipitado dissolvido, dialisado contra água e liofilizado.

O BTCI foi purificado por cromatografia de troca iônica utilizando resina DEAE-celulose, previamente ativada. O BTCI foi eluído utilizando tampão fosfato 10 mM, pH 7,3 e gradiente linear de NaCl (0 a 800 mM). As frações correspondentes ao pico de extração do BTCI foram dialisadas e liofilizadas.

### Avaliação da Pureza do BTCI e dos peptídeos

A análise da pureza e a identificação da massa molecular dos componentes moleculares obtidos das purificações do BTCI e dos peptídeos hipotensores sintetizados foram analisados em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III sob controle do programa computacional Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, ALE). A amostra foi dissolvida em água ultrapura (10-20  $\mu\text{L}$ ). Utilizando parafilme como suporte para as gotas de cada mistura, 1,0  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi misturado em 3  $\mu\text{L}$  em uma solução de matriz saturada de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinâmico contendo 5 mg de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinâmico, 200  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 250  $\mu\text{L}$  de acetonitrila e 50  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético). Um  $\mu\text{L}$  da mistura foi depositado em triplicata em uma placa de MTP AnchorChip 600/384. Após a secagem completa das amostras à temperatura ambiente, as análises por meio de espectrometria de massa foram realizadas.

Os espectros foram adquiridos a partir de 200 disparos de laser tipo *Smart Beam* à frequência de 100 Hz em modo refletido (peptídeos) ou linear (BTCI) e positivo. Para essas análises foi realizada calibração externa com uma mistura padrão de peptídeos e proteínas em uma faixa  $m/z$  700 a 4000 e 4000 a 20000. Essas faixas de massas moleculares dos calibrantes compreendem as massas moleculares nominais dos componentes das amostras de interesse: BTCI  $\sim$  9100 Da, Bk  $\sim$  1060 Da, Bk<sub>1</sub>  $\sim$  1231 Da e Bk<sub>2</sub>  $\sim$  1232 Da.

Para confirmar a estrutura primária dos peptídeos sintetizados, foi utilizado o mesmo espectrômetro no modo LIFT™ (MS/MS) (Bruker Daltonics, ALE), que permitiu a fragmentação e aceleração dos íons precursores obtendo fragmentos que permitiram a identificação da sequência de aminoácidos envolvidos na cadeia peptídica.

### *Quantificação do BTCl e de Bk e análogos*

A concentração do BTCl em solução foi determinada espectrofotometricamente, utilizando o espectrofotômetro Biochrom Libra S 12 (Biochrom Libra Instruments, EUA) em 280 nm e a equação 2. O valor da absorvância de 1% de BTCl a 280 nm ( $A^{1\%}$ ) é 8,23:

$$\text{Equação (2)} \quad C \text{ (mg/mL)} = \frac{A_{280 \text{ nm}} \cdot 10}{A_{280 \text{ nm}}^{1\%}}$$

A quantificação dos peptídeos hipotensores purificados foi realizada a partir dos valores das absorvâncias em 205 nm, 215 nm e 225 nm, de acordo com o método de Murphy e Kies (1960). A concentração foi estimada utilizando as equações 3, 4 e 5 descritas abaixo:

$$\text{Equação (3)} \quad C \text{ (}\mu\text{g/mL)} = \left( \frac{X + Y}{2} \right) \cdot \text{fator de diluição}$$

Sendo,

$$\text{Equação (4)} \quad X = (A_{215 \text{ nm}} - A_{225 \text{ nm}}) \cdot 144$$

$$\text{Equação (5)} \quad Y = A_{205 \text{ nm}} \cdot 31$$

## **Análise Estrutural das Moléculas Bioativas**

### *Monitoramento por Fluorescência Estática*

As análises estruturais realizadas por fluorescência estática foram monitoradas utilizando o espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (Jasco Analytical Instruments, Japão), acoplado a um sistema Peltier JASCO ETC-273T (Jasco

Analytical Instruments, Japão) com circulação de água. Os parâmetros para a leitura foram ajustados para excitação a 295 nm com os “*slits*” de excitação e emissão ajustados para 5,0 nm cada um. Os dados foram considerados a partir da média de três medidas de fluorescência obtidas e processadas pelo programa “*Spectra Manager*”. A velocidade de coleta dos dados foi de 200 nm.min<sup>-1</sup>. Os espectros foram registrados e tratados utilizando o programa Spectra Manager (JASCO) e OriginPro 8.0. As análises foram realizadas em triplicata e foi calculado o desvio padrão (DP).

#### *Estrutura das serinoproteases na presença de Bk e dos análogos*

O monitoramento, em função do tempo, da estrutura das serinoproteases tripsina e quimotripsina (Sigma Aldrich), na presença dos peptídeos, foi realizado a partir do deslocamento do comprimento de onda dos espectros de emissão. Os peptídeos não interferem nas leituras dos espectros, uma vez que não apresentam resíduos de triptofano.

A análise foi realizada na concentração de 1:1 sendo a estrutura de cada protease estudada na presença da Bk e peptídeos análogos, separadamente. Primeiramente, foi coletado o espectro de cada serinoprotease. O peptídeo foi adicionado ao sistema a uma concentração de 1 µM. O primeiro espectro foi medido no tempo zero. Os demais espectros foram coletados em intervalos de um minuto até completar uma hora (60 minutos). As soluções utilizadas para os ensaios foram os tampões cujas condições favorecem a atividade ótima das proteases. Para a tripsina, o tampão utilizado foi Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 8,2, enquanto que para quimotripsina foi Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7,6.

Foram lidos espectros das proteases na ausência dos peptídeos, imediatamente após o preparo da solução e após 60 minutos, visando a acompanhar

o processo de auto-hidrólise das enzimas e validar os dados de fluorescência estática, mediante a supressão da intensidade de fluorescência.

Os dados foram analisados por meio de gráficos que mostram o espectro da enzima isolada e outros dois espectros, um coletado logo após a adição do peptídeo e outro após 60 minutos de reação peptídeo-protease. Além disso, foi obtida a coleção dos espectros coletados em função do tempo (0-60 minutos) para todos os ensaios.

#### Modificações estruturais do BTCl na presença de Bk e dos análogos

As mudanças conformacionais do BTCl na presença dos peptídeos foram investigadas por supressão da intensidade de fluorescência em função do pH. A estrutura terciária do BTCl a 25  $\mu\text{M}$  foi monitorada em diferentes pHs (5,0; 7,4; 9,0) a 37°C. A concentração utilizada para Bk e peptídeos análogos variou de 25 a 500  $\mu\text{M}$ . As emissões de fluorescência foram ajustadas de acordo com a equação clássica de Stern- Volmer (equação 6) (Lakowicz, 2004):

$$\text{Equação (6)} \quad F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$$

De acordo com a equação (6), F e  $F_0$  representam as intensidades de fluorescência na presença e na ausência dos peptídeos, respectivamente;  $K_{SV}$  é a constante de Stern- Volmer e Q é a concentração dos peptídeos.

As constantes de ligação entre o inibidor e os peptídeos foram calculadas utilizando a equação (7):

$$\text{Equação(7)} \quad \log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log[Q]$$

onde  $K_b$  é a constante de ligação e  $n$  é o número de locais de ligação por BTCl (Hu et al, 2004).

A análise estatística foi realizada utilizando o software de estatística (PAST) para a análise de dados (Hammer, Harper e Ryan, 2001). Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado para denotar uma diferença significativa.

### *Monitoramento por Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD)*

#### *Dimensões moleculares do BTCl na presença de Bk e dos análogos*

Os experimentos foram realizados em um analisador de espalhamento de luz DynaPro modelo LSR (Wyatt Technology Corporation, USA) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, São Paulo. Os dados hidrodinâmicos foram analisados utilizando o software Dynamics V6. Os valores considerados foram os obtidos da média de 30 registros para cada medida. A temperatura interna a 37°C foi controlada por um sistema Peltier acoplado ao equipamento.

A concentração das amostras utilizada nos experimentos de espalhamento de luz foi calculada pela opção "Optimization Calculator" do software, que fornece a concentração mínima ideal de detecção das amostras de acordo com a massa molecular.

O BTCl foi analisado na concentração de 25  $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4. Os peptídeos sintetizados foram solubilizados em Tris-HCl 2 mM pH 7,4 e analisados quanto à massa molecular e diâmetro hidrodinâmico, na concentração de 25  $\mu\text{M}$ .

Para avaliar a possível formação de complexos entre o BTCl e os peptídeos, o inibidor na concentração de 25  $\mu\text{M}$  foi misturado a cada um dos peptídeos em

concentrações estequiométricas (1:1), por 15 minutos a 37°C. A mistura foi transferida para cubeta de quartzo previamente lavada com detergente Hermax<sup>®</sup> e isopropanol e secada com ar comprimido. Os dados foram obtidos e analisados quanto à massa molecular e ao diâmetro hidrodinâmico do complexo, a partir da relação entre o sinal da intensidade da luz espalhada e a massa da amostra em solução. Foram considerados somente os valores com polidispersividade menor que 15%, o que caracteriza uma solução monodispersa.

#### *Monitoramento por Dicroísmo Circular*

##### *Estrutura secundária do BTCI na presença de Bk e dos análogos*

As análises por dicroísmo circular foram realizadas a partir de espectros obtidos no espectropolarímetro Jasco J-815 (Analytical Instruments, Japão) acoplado a um sistema Peltier (Analytical Instruments, Japão) para controle da temperatura. A leitura dos espectros foi realizada em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. A média dos espectros foi obtida a partir de cinco varreduras adquiridas. De todos os dados, foi subtraída a contribuição do tampão. A velocidade de coleta dos dados foi de 100 nm.min<sup>-1</sup>. A formação de ozônio em comprimento de onda distante da região ultravioleta foi evitada com fluxo de nitrogênio gasoso para o interior do espectropolarímetro. Os programas utilizados para o registro e tratamento dos dados foram o Spectra Analysis (JASCO) e o OriginPro 8.0.

Os dados registrados pelo programa Spectra Manager foram convertidos de milgraus para elipticidade residual molar usando a seguinte equação (8):

$$\text{Equação (8)} \quad \theta (\text{grau} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}) = 112 \cdot \alpha / 10 \cdot C \cdot \ell$$

Onde,  $\alpha$  é o sinal dicróico em miligraus,  $C$  é a concentração da amostra ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e  $l$  é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada.

A concentração das amostras utilizadas foi de 10  $\mu\text{M}$  tanto para o inibidor quanto para os peptídeos em Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C. A estrutura da Bk e análogos também foi monitorada em Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C. Para analisar os espectros dos peptídeos isolados foi necessário utilizar uma concentração alta correspondente a 70  $\mu\text{M}$  para ser detectado pelo equipamento pois a baixas concentrações não foi registrado nenhum sinal.

A porcentagem das estruturas secundárias do BTCI, na ausência e na presença dos peptídeos, e em diferentes pHs, foi calculada a partir do ajuste das curvas dicróicas nos comprimentos de onda de 260 a 190 nm a 37 °C, utilizando o programa CDNN 2.1 ([bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn](http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn); Böhm, Muhr e Jaenicke, 1992). Para monitorar as possíveis alterações conformacionais na estrutura do BTCI, na presença de Bk e dos análogos, anteriormente ao cálculo das estruturas secundárias, foram subtraídas as contribuições dos peptídeos como linha de base dos espectros do BTCI.

### **Análise Funcional das Moléculas Bioativas**

Os ensaios descritos abaixo envolvem as serinoproteases tripsina e quimotripsina pancreáticas bovinas (Sigma Aldrich, USA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e separadamente para cada protease, utilizando seus respectivos substratos e tampões de atividade. A absorbância das amostras foi determinada a 410 nm em um espectrofotômetro conjugado a uma leitora de placas SpectraMax Plus 384 Microplate (Molecular Devices, USA).

### *Ensaio in vitro da atividade de proteases sobre a Bk e análogos*

Testes enzimáticos foram realizados para as serinoproteases, tripsina e quimotripsina, que reconhecem sítios de clivagem presentes na Bk. Para analisar a capacidade de clivagem dessas proteases sobre a Bk e os análogos, foi estudada a interação entre as proteases e os peptídeos, medida por um método colorimétrico utilizando substratos sintéticos para tripsina, o BAPNA (*N*α-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) (Sigma Aldrich, USA) e para quimotripsina, o GPNA (*N* - glutaryl - L - phenylalanine - p - nitroanilide) (Sigma Aldrich, USA). Quando livres em solução, as proteases clivam esses substratos após reconhecer os sítios específicos como arginina/lisina, no caso da tripsina e fenilalanina no caso da quimotripsina. Após a ação das proteases, é liberado partir destes substratos o produto para-nitroanilida que apresenta coloração amarelada em solução, indicando 100% da atividade enzimática das proteases.

Foram preparadas soluções de tripsina  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e de quimotripsina  $630 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em HCl 1 mM. Os substratos BAPNA e GPNA foram diluídos em 1,0 mL, sendo 500  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) e 500  $\mu\text{L}$  de tampão de ensaio para tripsina (Tris-HCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  20 mM, pH 8,2) e quimotripsina (Tris-HCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  20 mM, pH 7,6), na concentração final de  $430 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente (Erlanger, Kokowsky e Cohen, 1961).

Os peptídeos foram adicionados nas concentrações de 0,1 a 1,0  $\mu\text{M}$  às alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  de proteases com quantidade de tampão de ensaio suficiente para um volume final de 80  $\mu\text{L}$ . Após 15 minutos, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de substrato correspondente a cada protease por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de ácido acético 30%. Foi feito o controle da reação da mesma maneira na ausência dos peptídeos.

O mesmo ensaio foi realizado até a etapa anterior à adição do substrato cromogênico. As amostras contendo os peptídeos a concentração final de 1,0  $\mu\text{M}$  foram submetidas à HPLC para a separação dos produtos de degradação e identificados por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF, com base nos procedimentos descritos anteriormente.

A análise estatística foi realizada utilizando o software de estatística (PAST) para a análise de dados (Hammer, Harper e Ryan, 2001). Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado para denotar uma diferença significativa.

#### *Ensaio in vitro da atividade do BTCl na presença de Bk e análogos*

O efeito inibitório do BTCl sobre as serinoproteases, na presença dos peptídeos, foi estudado em concentração fixa do inibidor que inibe a tripsina (10  $\mu\text{M}$ ) e a quimotripsina (40  $\mu\text{M}$ ).

O BTCl foi incubado com os peptídeos durante 15 minutos. Após este tempo, 40  $\mu\text{L}$  da solução de protease, cuja preparação está descrita acima, foram adicionados e após 15 minutos, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de substrato correspondente a cada protease, seguido de incubação por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de ácido acético 30%. O controle da reação contra tripsina e quimotripsina foi feito na ausência dos peptídeos.

A análise estatística foi realizada utilizando o software de estatística PAST para análise de dados (Hammer, Harper e Ryan, 2001). Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado para denotar uma diferença significativa.

### *Ensaio ex vivo da atividade de Bk e análogos*

Este ensaio foi desenvolvido sob a supervisão da professora Dra Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz no Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília- UnB. Cobaias (*Cavia porcellus*), pesando entre 200 e 300 gramas e em jejum de 24 horas, foram eutanasiadas com overdose de anestésicos a  $120 \text{ mg.kg}^{-1}$  (quetamina e xilazina), de acordo com protocolo do Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Processo Número 737402/2008. Pequenos segmentos de íleo, com cerca de 2 cm de comprimento foram dissecados e lavados cuidadosamente com solução de Tyrode ( $\text{g.L}^{-1}$ : NaCl 8,0; KCl 0,2;  $\text{CaCl}_2$  0,2;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,21;  $\text{NaHCO}_3$  1,0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,055; glicose 1,0) a  $35^\circ\text{C}$ . O segmento de íleo foi amarrado em uma das extremidades a um bastão de vidro e imerso no banho em uma cuba de vidro, com capacidade para 10 mL e dotado de um sistema de aquecimento da solução fisiológica, cuja temperatura foi de  $35^\circ\text{C}$ . À outra extremidade, atou-se um fio de seda que foi acoplado ao transdutor isométrico F-60 conectado ao polígrafo, ambos da NARCO Bio-Systems (USA).

Esse sistema foi estabilizado por aproximadamente 30 minutos, mantendo-se constante o arejamento com carbogênio e trocando-se a cada 10 minutos a solução de Tyrode. Após esse período, histamina ( $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) foi adicionada, registrando a contração e avaliando-se a sensibilidade do sistema utilizado. A solução fisiológica foi trocada três vezes a fim de se remover a droga utilizada. Previamente, o íleo foi testado com a Bk sintética Sigma-Aldrich em três diferentes concentrações (0,1; 0,5 e  $1,0 \mu\text{M}$ ).

Após todo este sistema estar preparado, primeiramente foi avaliada a ação hipotensora da Bk e dos peptídeos análogos sobre o íleo. Os peptídeos sintetizados, Bk,  $\text{Bk}_1$  e  $\text{Bk}_2$  (0,001; 0,005 e  $0,01 \mu\text{M}$ ) foram adicionados ao sistema e o

deslocamento do músculo liso de cobaia foi registrado. Para cada amostra adicionada houve intervalo de aproximadamente dois minutos até ser observada estabilização do movimento do íleo. Estas concentrações foram definidas a partir de testes para determinar a concentração mínima que apresentava efeito sobre o músculo liso. Após a análise da ação dos peptídeos, o BTCI (8,0  $\mu\text{M}$ ) foi testado isoladamente. A concentração do BTCI foi determinada a partir de testes desde concentrações baixas a altas e foi observado que em nenhum caso o BTCI apresentou efeito sobre o íleo.

Com a finalidade de verificar se existe interferência na ação hipotensora dos peptídeos (0,01  $\mu\text{M}$ ) na presença do BTCI (8,0  $\mu\text{M}$ ), a Bk e os análogos foram testados na presença do inibidor e o deslocamento foi registrado.

O íleo também foi testado com as serinoproteases isoladas (0,01  $\mu\text{M}$ ) e na presença dos peptídeos (0,01  $\mu\text{M}$ ) para analisar a influência destas proteases sobre na ação da Bk e dos análogos. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Neste ensaio foi utilizado o mesmo fragmento de íleo e para verificar a veracidade dos dados obtidos, ao final dos ensaios, o mesmo fragmento foi testado novamente com a Bk sintética Sigma-Aldrich em três diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$ ).

A análise estatística foi realizada utilizando o Paleontológico Estatística (PAST) Pacote de Software para a Educação e a análise de dados (Hammer, Harper e Ryan, 2001). Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado para denotar uma diferença significativa.

#### *Ensaio in vivo da atividade de Bk e análogos*

Este ensaio foi desenvolvido pelo professor Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino e equipe, no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de

Goiás- UFG. Todos os experimentos foram realizados em ratos Wistar adultos (280-350 g), obtidos do biotério central da UFG. Os procedimentos experimentais foram concebidos com estrita observância às diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para cuidado e uso de animais de laboratório aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (número de protocolo 034/12).

Os ratos foram anestesiados com halotano 2-3% (Cristália Ltda, Brasil) em 100% de O<sub>2</sub> e cateteres foram inseridos nas duas veias femorais direitas (para infusão intravenosa de drogas) e na artéria femoral direita (para registro da pressão arterial pulsátil). Posteriormente, o halotano foi substituído por uretano (1,2 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo, iv; Sigma-Aldrich Co., EUA). A traqueia foi canulada para reduzir a resistência das vias aéreas. Em seguida, os animais foram colocados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments) e o dorso foi aberto, expondo o rim esquerdo. Uma sonda em miniatura (probe 1RB, Transonic Systems, USA) foi implantada ao redor da artéria renal esquerda para o registro do fluxo sanguíneo renal (FSR). Uma segunda sonda em miniatura (probe 2RB, Transonic Systems, EUA) foi implantada ao redor da artéria aorta abdominal para o registro do fluxo sanguíneo aórtico (FSA). Durante todo o experimento, a temperatura corporal foi mantida entre 36 e 37°C com o auxílio de uma mesa térmica.

A pressão arterial pulsátil (PAP) foi obtida conectando a cânula arterial a um transdutor de pressão (MLT0380, Austrália) acoplado a um amplificador (Bridge Amp, ML221, Austrália). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 1000 registros.s<sup>-1</sup>, utilizando um conversor analógico digital (PowerLab 4/25, ML845, Austrália). A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir da integral do sinal da PAP (PowerLab 4/25, ML845, Austrália). A frequência cardíaca (FC) foi calculada

como frequência instantânea a partir do sinal de PAP (PowerLab 4/25, ML845, Austrália).

O FSR e o FSA foram registrados por fluxometria de tempo de trânsito como descrito por (Welch *et al.*, 1995). Para isto, a sonda em miniatura foi conectada a um fluxômetro T206 (Transonic Systems, EUA), que permite determinar o fluxo em valores absolutos ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Os sinais obtidos foram enviados ao sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab 4/25, ML845, Austrália). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 1000 registros.  $\text{s}^{-1}$ . As variações do FSR e do FSA foram calculadas como a razão percentual em relação ao valor basal (%FSR e %FSA), de acordo com as equações 9 e 10:

$$\text{Equação (9)} \quad \%FSR = \left[ \frac{FSR_{final} - FSR_{basal}}{FSR_{basal}} \right] \cdot 100$$

$$\text{Equação (10)} \quad \%FSA = \left[ \frac{FSA_{final} - FSA_{basal}}{FSA_{basal}} \right] \cdot 100$$

A condutância vascular renal (CVR) e condutância vascular aórtica (CVA) foram obtidas pela razão entre o FSR / FSA e PAM, respectivamente. As variações da CVR e CVA foram calculadas como variação percentual em relação ao valor basal (%CVR e %CVA), utilizando-se as seguintes equações 11 e 12:

$$\text{Equação (11)} \quad \%CVR = \left[ \frac{CVR_{final} - CVR_{basal}}{CVR_{basal}} \right] \cdot 100$$

$$\text{Equação (12) } \%CVA = \left[ \frac{CVA_{final} - CVA_{basal}}{CVA_{basal}} \right] \cdot 100$$

Em princípio, foram infundidas doses crescentes de BTCI (0,3; 3; 30 e 300  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.v.) para padronização da dose apropriada. Posteriormente, em outro grupo, os peptídeos relacionados com a Bk (Bk, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>, 120  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.v.) foram testados de forma isolada e associados com BTCI (3  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.v.).

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os efeitos da infusão dos peptídeos relacionados com a Bk e BTCI sobre os parâmetros cardiovasculares foram analisados pelo método ANOVA one-way. Quando os grupos diferiram significativamente, o pós-teste de Fisher foi aplicado, utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 6.03 para Windows (GraphPad Software, EUA). Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado para denotar uma diferença significativa.

### *Referências Bibliográficas*

- Böhm, G.; Muhr, R.; Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra. *Protein Eng.*, v. 5, p. 191–195, 1992.
- Chan, W. C.; WHITE, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach. Oxford University Press, Oxford, 2000.

- Erlanger, B.F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 95, p. 271–278, 1961.
- Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, vol. 35, pp. 161-214, 1990.
- Hammer, M.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.*, v. 4, p. 1–9, 2001.
- Hu, Y.J.; Liu, Y.; Hou, A.X.; Zhao, R.M.; et al. Studies on the interaction between rare-earth salts of heteropoly  $\text{EuHSiMo}_{10}\text{-W}_2\text{O}_{40}\cdot 25\text{H}_2\text{O}$  and bovine serum albumin. *Acta Chim. Sin.*, v. 62, p. 1519–1523, 2004. (In Chinese)
- Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem*, v. 34, 595–598, 1970.
- Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. *Springer*. Second edition, p. 698, 2004.
- Merrifield B. Solid-Phase Peptide Synthesis. *Peptides: Synthesis, Structures, and Applications*, p.93-169, 1995.
- Mundin N. Prospecção de Bradicininas de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade de Brasília- UnB, 2008.
- Murphy JB, Kies MW. Nota sobre a determinação espectrofotométrica de proteínas em soluções diluídas. *Biochimical Biophysics Acta*, v. 45 , p. 382 – 384, 1960.

Ventura M M, Xavier-Filho J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*).I. Purification and partial characterization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 38, p.553–566, 1966.

## Resultados e Discussão

### Seção I

#### **Modulação da ação hipotensora da bradicinina e de análogos de bradicinina por serinoproteases**

##### *Obtenção de Bk, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>*

Para ser desenvolvido o estudo proposto nessa tese, foi necessário inicialmente obter as moléculas purificadas (ver métodos *Obtenção das Moléculas Bioativas*). Após a síntese manual da Bk e dos análogos (Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>), estes peptídeos foram purificados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa (Figura 7A). A pureza e as massas moleculares dos peptídeos foram verificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) e apresentadas na figura 7B.

O rendimento da síntese de Bk e dos análogos Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub> foi de 397,23 mg (37,47%), 421,67 mg (34,23%) e 419,40 mg (34,02%), respectivamente. Estes peptídeos foram cromatografados e recromatografados em RP-HPLC para a obtenção destas moléculas eluídas na forma pura. A Bk e os análogos foram eluídos em concentrações de aproximadamente 35%, 32% e 29% de acetonitrila (Figura 7A), variações compatíveis com as diferenças na composição e na hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos e o modo de retenção na coluna utilizada para a purificação. A pureza e a massa molecular de cada peptídeo foi determinada utilizando o espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. Os perfis cromatográficos (Figura 7A) e os espectros de massa (Figura 7B) apresentaram somente um pico de

eluição e um pico de massa, respectivamente, para cada peptídeo analisado, confirmando o grau de pureza dessas moléculas. As massas moleculares para Bk, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub> foram 1060,7 Da, 1231,7 Da e 1232,7 Da, respectivamente (Figura 7B).

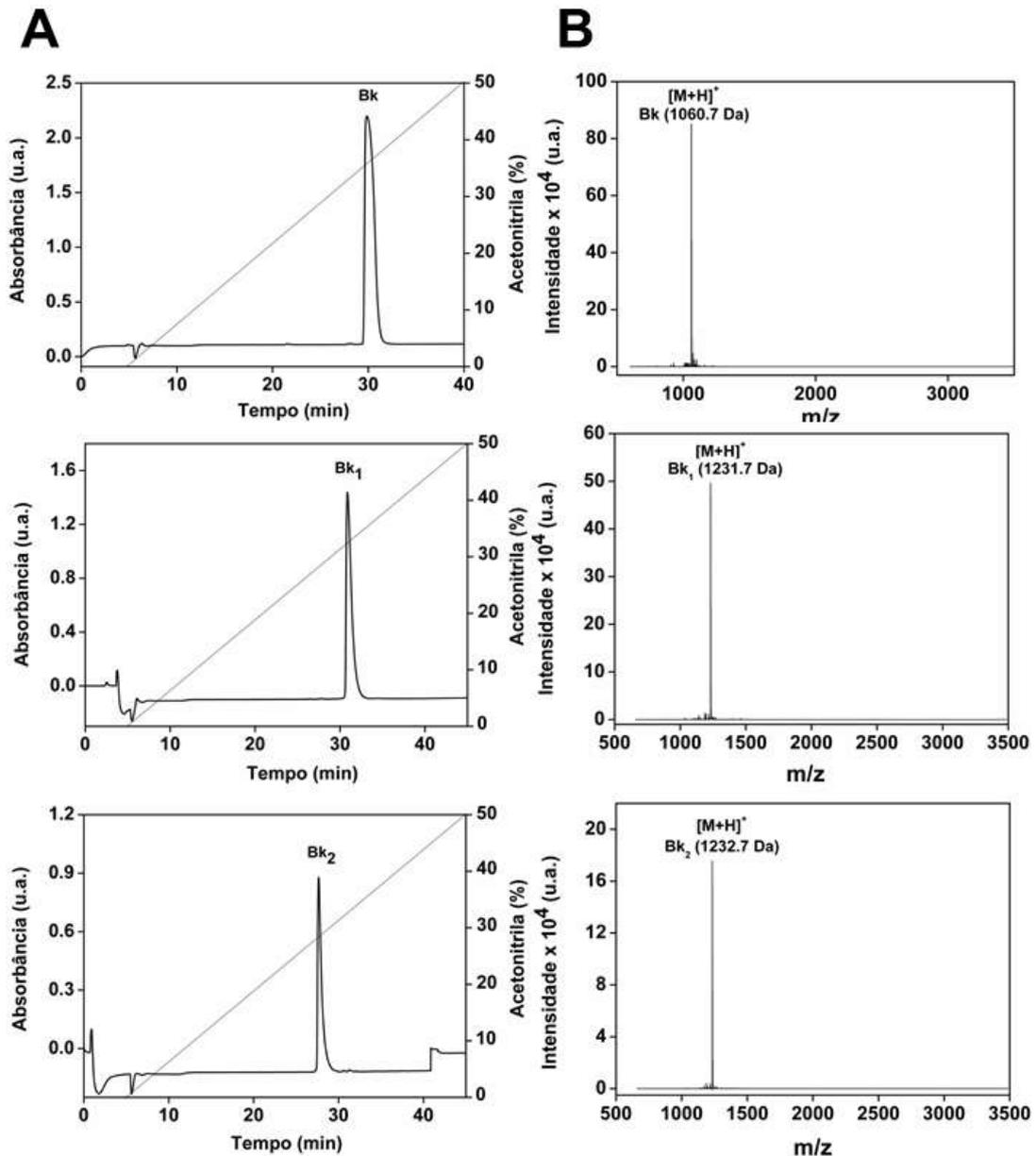


Figura 7. Purificação dos peptídeos Bk, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>. **A)** Cromatogramas dos peptídeos eluídos sob gradiente de acetonitrila (ACN) de 5-95% em coluna de fase reversa semipreparativa 218TP510, utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A absorbância foi monitorada em 216 nm. **B)** Espectros de massa MALDI-TOF/MS representando a massa molecular [M+H]<sup>+</sup> e o grau de pureza dos peptídeos.

### Análise estrutural e funcional de serinoproteases sobre o metabolismo de Bk e dos análogos

A estrutura de serinoproteases foi monitorada por fluorescência estática na presença da Bk e dos análogos considerando que eles são substratos sujeitos à clivagem por quimotripsina e tripsina. A intensidade máxima de cada espectro das enzimas, na ausência (primeiro ponto) e na presença da Bk e dos análogos, em função do tempo, está representada na figura 8.

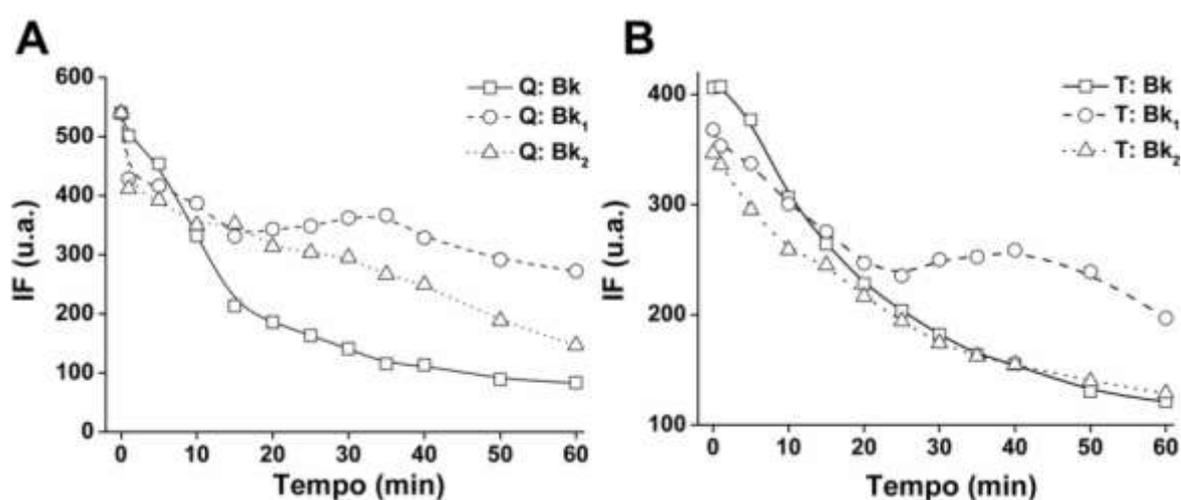


Figura 8. Intensidade de fluorescência de serinoproteases, registrada em 331,5 nm para tripsina e 332 nm para quimotripsina, dependente do tempo, na presença de Bk e dos análogos a 37°C. **A)** Quimotripsina em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH 7,6. **B)** Tripsina em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH 8,2. IF é intensidade de fluorescência.

Não foram apresentados os registros de todos os espectros devido ao intervalo de tempo ter sido muito próximo, o que prejudicaria na clareza da figura. Na figura 8 observa-se a redução da intensidade de fluorescência na presença da Bk, bem como dos análogos. As bandas de emissão estão posicionadas nos comprimentos de onda de 331,5 nm para tripsina e 332 nm para quimotripsina, sem

nenhum deslocamento com a adição dos peptídeos. Isso indica que mesmo na presença dos peptídeos os resíduos de triptofano mantiveram suas posições inalteradas na estrutura das enzimas. No entanto, a redução da intensidade de fluorescência indica, além da formação de complexos das enzimas com os peptídeos e ação proteolítica sobre os mesmos, que estas enzimas sofrem mudanças conformacionais, sem retornar ao estado inicial, após 60 minutos. Esses resultados sugerem que dois eventos podem estar ocorrendo durante o processo de interação dessas moléculas. Em um deles, os peptídeos que associam na região catalítica das enzimas, são clivados, podendo também associar em outros sítios inespecíficos das enzimas; ou, mesmo clivados, o produto formado poderia ser deslocado tardiamente do sítio catalítico. Outra possibilidade seria a autodegradação das enzimas em decorrência do tempo considerado para esse ensaio.

Para verificar se a redução na intensidade de fluorescência das serinoproteases não foi influenciada por autodegradação, foram coletados espectros de cada enzima logo após o preparo das amostras e após uma hora em solução. As figuras 9A e 9B mostram os espectros de quimotripsina e tripsina, respectivamente. Nota-se que os espectros são semelhantes, apresentando diferença mínima entre o primeiro registro (enzima imediatamente após o preparo da solução) e o segundo registro dos espectros (enzima após sessenta minutos em solução). Isto indica que a diminuição da intensidade de fluorescência das serinoproteases em função do tempo está relacionada à presença da Bk e dos análogos em solução e descarta a hipótese de ser devido a um processo autocatalítico.

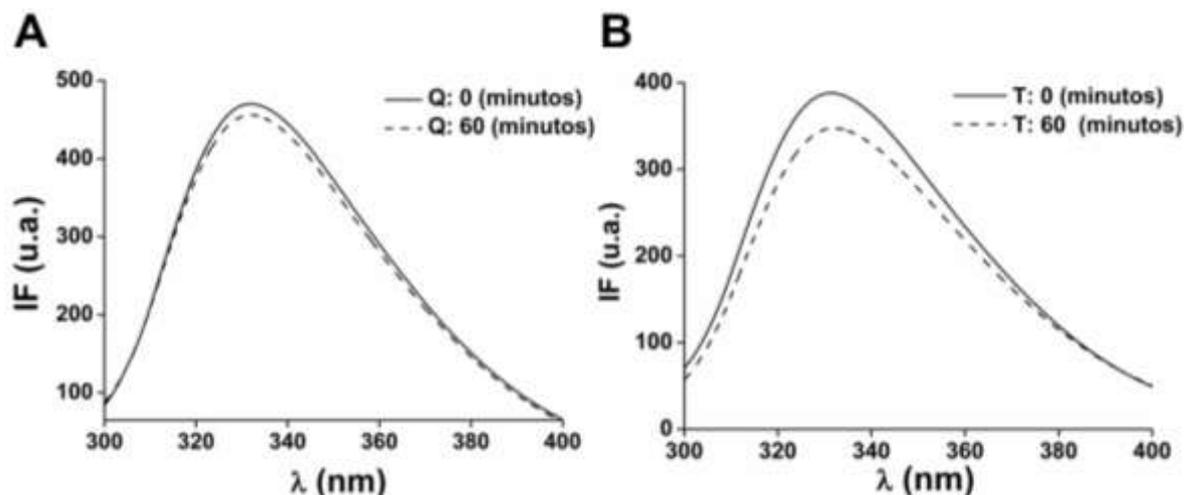


Figura 9. Espectros de emissão de fluorescência de serinoprotases dependente do tempo (0 a 60 minutos) a 37 °C. **A)** Quimotripsina em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH 7,6. **B)** Tripsina em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH 8,2. IF é intensidade de fluorescência.

Após monitorar as modificações conformacionais das serinoproteases na presença da Bk e dos análogos, e observar que estas alterações permaneceram após uma hora, a ação das serinoproteases sobre a Bk e os análogos foi avaliada. O objetivo deste experimento foi verificar se estas alterações que ocorreram nas estruturas das serinoproteases ocorriam em decorrência da ação proteolítica sobre a Bk e os análogos.

A figura 10 mostra a atividade residual das serinoproteases sobre concentrações crescentes da Bk e os análogos (0 a 1,0 μM). Na ausência da Bk e dos análogos (concentração 0 μM), a quimotripsina apresentou ação sobre o substrato cromogênico GPNA em aproximadamente 100% assim como para tripsina que apresentou ação sobre o substrato BPNA na mesma proporção (~ 100%). A partir da adição de concentrações crescentes da Bk e dos análogos, houve diminuição da atividade residual das serinoproteases, não seguindo um padrão concentração-dependente. Este ensaio permitiu a formulação de duas hipóteses: a) as

serinoproteases não clivaram os substratos cromogênicos por apresentar preferência à clivagem da Bk e dos análogos e/ou b) a Bk e os análogos ligam-se ao sítio ativo das serinoproteases, são clivados e interferem desse modo na ação proteolítica delas sobre os substratos.

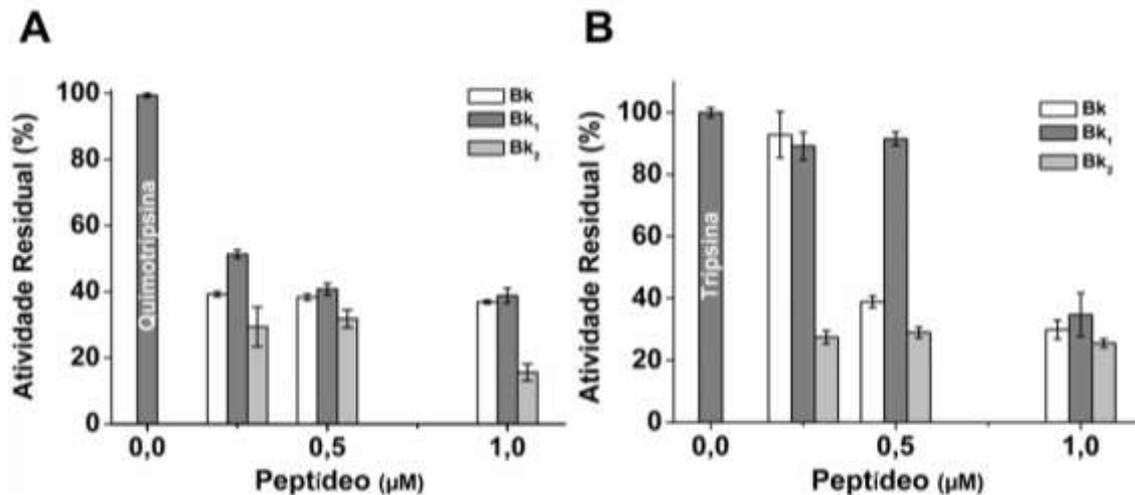


Figura 10. Atividade residual relativa de serinoproteases na presença de diferentes concentrações de peptídeos (0-1,0 μM). A barra na cor branca representa o ensaio para Bk, as barras em cinza escuro e cinza claro representam os ensaios para os análogos Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>, respectivamente. **A)** Quimotripsina (630 μg.mL<sup>-1</sup>) em Tris-HCl 50 mM CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH 7,6 a 37°C. **B)** Tripsina (64 μg.mL<sup>-1</sup>) em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM pH 8,2.

A tripsina e a quimotripsina são proteases da mesma família e desempenham funções catalíticas semelhantes, apresentando resíduos da tríade catalítica formada pela His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup> e Ser<sup>195</sup> (numeração dos resíduos de aminoácidos da quimotripsina), que, apesar de conservados, reconhecem substratos diferentes (Rawlings e Barrett, 1994; Polgár, 2005). A tripsina atua, predominantemente, sobre a porção C-terminal de resíduos de lisina e arginina presentes em proteínas e/ou peptídeos, enquanto a quimotripsina cliva, predominantemente, as regiões C-terminal

de resíduos de aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina, (Appel, 1986). Os peptídeos do presente estudo apresentam regiões de clivagem para serinoproteases. Nos ensaios de atividade enzimática, foram utilizados dois tipos de substratos: a) cromogênicos como BAPNA para tripsina e GPNA para quimotripsina; b) funcionais: Bk e análogos. Neste ensaio, na ausência dos peptídeos, as proteases clivam os substratos BAPNA/GPNA, e é liberado o produto p-nitroanilida de coloração amarela, sendo detectado por espectrofotometria no comprimento de onda de 410 nm. Na presença dos peptídeos, é observada diminuição da clivagem dos substratos cromogênicos. A atividade residual apresentada na figura 10 sugere que tanto a tripsina quanto a quimotripsina apresentaram diminuição da ação catalítica sobre os substratos cromogênicos, após serem incubadas com Bk e análogos.

Para verificar qual hipótese mais provável dentre as duas citadas acima, cada serinoprotease foi incubada com a Bk por quinze minutos, conforme descrito em Materiais e Métodos (ver **Análise Funcional das Moléculas Bioativas**), e as soluções foram submetidas à separação por HPLC. Este teste foi desenvolvido com a finalidade de observar se a Bk (1,0  $\mu\text{M}$ ) e os análogos (1,0  $\mu\text{M}$ ) seriam degradados pelas serinoproteases e identificar os possíveis fragmentos obtidos por MALDI-TOF. A Bk pré-tratada com quimotripsina foi hidrolisada em aproximadamente 90% resultando em fragmentos identificados por Bk (1-5) e Bk (1-8), sendo encontrados apenas ~10% de Bk com a estrutura intacta (Figura 11). No pré-tratamento com tripsina, Bk ficou na forma íntegra ~95% porém foram identificados fragmentos Bk (2-9). A mesma análise foi realizada para os análogos da Bk. O análogo que sofreu maior ação proteolítica foi Bk<sub>2</sub> com apenas ~10 % na forma intacta, tanto para quimotripsina quanto para tripsina. A ação das duas serinoproteases sobre Bk<sub>1</sub> foi de

aproximadamente 80 a 90% sendo predominante a forma hidrolisada deste análogo (Figura 11). Os resultados apresentados corroboram com dados reportados na literatura em que a Bk apresenta regiões favoráveis à ação proteolítica de endopeptidases (Mäkinen, Mäkinen e Syed, 1995).

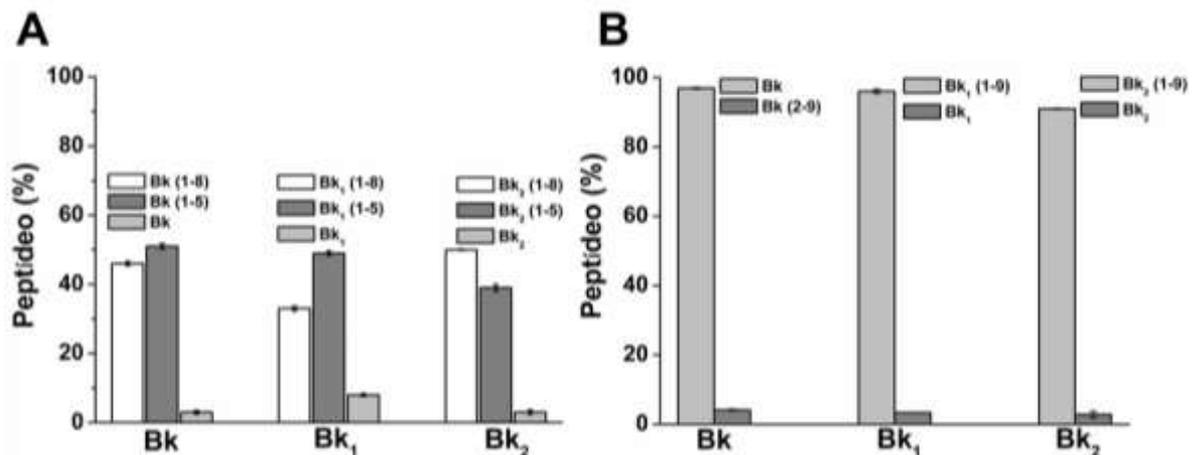


Figura 11. Hidrólise da Bk e dos análogos por **A)** quimotripsina e **B)** tripsina. Concentrações utilizadas: Bk, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub> (10,0 μM), quimotripsina (10,0 μM) e tripsina (10,0 μM). 100% corresponde ao total de Bk e análogos adicionados ao sistema. Fragmentos Bk (1-5) e (1-8): hidrólise de Bk e dos análogos por quimotripsina após resíduos Phe. Fragmentos Bk (2-9) e dos análogos (1-9): hidrólise de Bk e dos análogos, respectivamente, por tripsina após resíduos Arg.

Após estes ensaios, as hipóteses propostas no estudo, como: a) as serinoproteases apresentam afinidade à Bk e aos análogos como substratos e/ou b) a Bk e os análogos interferem sobre a ação proteolítica das serinoproteases, podem ser discutidas. Inicialmente, os ensaios foram realizados incubando cada serinoprotease com Bk e análogos, separadamente, por quinze minutos e, após este tempo, os substratos cromogênicos foram adicionados. Nesse ensaio, as serinoproteases, durante os quinze minutos, estavam ativas hidrolisando a Bk e os análogos, como confirmado pelos cromatogramas por RP-HPLC obtidos para os

peptídeos hidrolisados, resultantes da ação enzimática. Após a adição dos substratos cromogênicos, apenas parte das serinoproteases encontraram-se ativas, pois ao agirem sobre a Bk e os análogos, sofreram alterações conformacionais como demonstrado por meio dos ensaios fluorimétricos. A alteração estrutural das proteases na presença dos peptídeos podem também ser atribuída aos fragmentos provenientes da clivagem não terem sido liberados para a solução e permaneceram na estrutura das proteases, ou peptídeos intactos interagindo em sítos inespecíficos das enzimas. Nesse caso, esses fragmentos poderiam interferir no processo de excitação e, conseqüente, emissão de fótons dos resíduos de triptofano destas moléculas, funcionando como atenuadores da fluorescência (Lakowicz, 2004). Além disto, não foram observados fragmentos de autólise das serinoproteases.

#### *Análise da ação vasoconstritora de Bk e dos análogos sobre músculo liso*

Após constatar a ação proteolítica das serinoproteases sobre a Bk e os análogos e verificar a diminuição de sua capacidade de proteólise, após a interação com os substratos peptídicos, foi desenvolvido um ensaio *ex vivo* para avaliar se a Bk e os análogos são moléculas ativas. Além disso, a possível alteração da atividade de cada um destes peptídeos na presença das serinoproteases foi avaliada, em função da hidrólise.

A Bk e os análogos foram testados utilizando músculo liso de íleo de cobaia que apresenta alta concentração de receptores B1 e menor concentração de receptores B2. A Bk, quando age no receptor B1 induz contrações e, quando age no receptor B2, encontrado predominantemente no endotélio, induz vasodilatação. Este ensaio permitiu identificar se a Bk apresenta-se na forma ativa na presença das serinoproteases. Portanto, nesse caso, o objetivo não foi analisar a ação hipotensora

da Bk, mas sim analisar se estes peptídeos são ativos sobre os receptores presentes na musculatura lisa.

Concentrações crescentes de Bk foram capazes de induzir a contração do músculo liso, em forma de dose-resposta (Figura 12). No entanto, quando pré-tratada com serinoproteases, apresentou significativa redução na sua ação de contração.

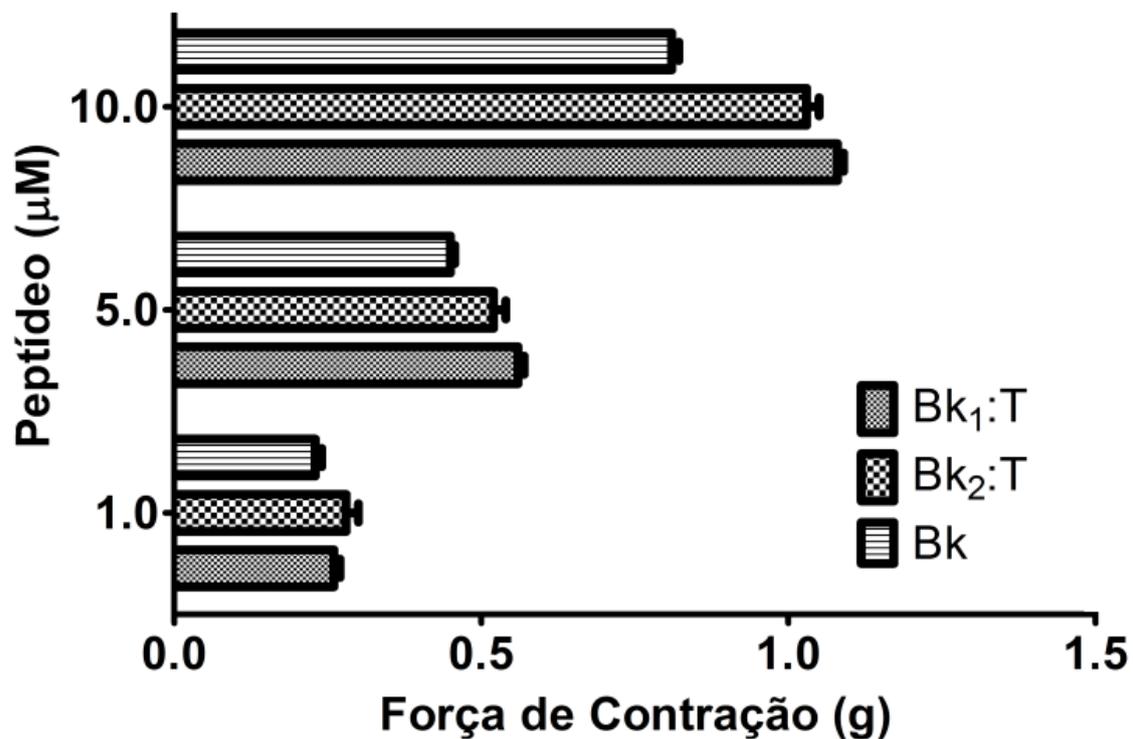


Figura 12. Ação constritora de Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>, previamente incubados com tripsina, sobre músculo liso de íleo de cobaia em diferentes concentrações (1,0; 5,0 e 10,0 µM). Os dados de Bk foram utilizados como controle positivo.  $P < 0,05$ , comparado com a Bk à mesma concentração.

Os análogos da Bk não exerceram nenhum efeito sobre o músculo liso, indicado pela ausência de registros de deslocamento pelo transdutor. A tabela 1 (ver introdução) apresentada na introdução mostra a sequência de resíduos de aminoácidos presentes na Bk e nos análogos. Os análogos apresentam uma extensão com dois resíduos a mais além do resíduo Arg<sup>9</sup> na porção C-terminal. Como

já descrito na literatura, a estimulação do deslocamento do músculo ileal ocorre pela Bk, especificamente por esse peptídeo apresentar um resíduo de aminoácido, Arg<sup>9</sup>, exposto e livre na porção C-terminal. Esse resíduo é responsável pela interação com os receptores que, uma vez ativado pela interação com a Bk, promove a liberação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Nakashima et al, 1993), resultando no efeito de contração da musculatura lisa. No caso dos análogos aqui testados, a ausência do efeito de contração da musculatura lisa se deve basicamente ao fato dos resíduos de Arg<sup>9</sup> não estarem acessíveis, na região C-terminal, ao receptor do tipo B1, condição requerida para interação deste com o peptídeo e consequente contração da musculatura lisa.

Para quantificar a força de contração (*g*) promovida pelos análogos de Bk em estudo, foi necessária a hidrólise destes análogos utilizando tripsina e quimotripsina, para disponibilizar o acesso ao resíduo de Arg<sup>9</sup>. Quando pré-tratados com tripsina, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub> induziram contração do músculo liso, em forma de dose-resposta (Figura 12). Portanto, a exposição do resíduo Arg<sup>9</sup> no C-terminal de ambos os análogos foi de fundamental importância para a interação com os receptores de Bk presentes no íleo, permitindo maior ação dos análogos quando comparados à Bk. Como se sabe, Arg<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Gly<sup>4</sup>, Phe<sup>5</sup>, Pro<sup>7</sup>, Phe<sup>8</sup> e Arg<sup>9</sup> na estrutura primária da Bk são muito importantes para a ativação do músculo liso dos mamíferos (Regoli e Barabé, 1980). Interessantemente, a presença de Val<sup>1</sup> em ambos os análogos foi responsável por induzir maior força de contração em aproximadamente 1,3 vezes quando comparado com Bk. Em contraste, os análogos pré-tratados com quimotripsina não foram capazes de induzir a contração do músculo liso, destacando que neste caso o efeito da quimotripsina tem influência expressiva na diminuição da ação e da meia-vida da Bk e dos análogos (Figura 12). Estes dados também foram demonstrados por meio

dos ensaios *in vitro* em que a tripsina e a quimotripsina apresentaram alta ação proteolítica sobre a Bk e os análogos (Figura 12). Neste caso, apesar da presença de Val<sup>1</sup> que aumenta a força de contração dos peptídeos pré-tratados com tripsina, a clivagem em Phe<sup>5</sup> e Phe<sup>8</sup> por quimotripsina leva à diminuição da atividade de ambos.

Estes dados mostraram que a Bk apresenta meia-vida curta devido à ação de serinoproteases como quimotripsina e tripsina presentes em um mesmo meio reacional. Já os análogos foram testados com o intuito de analisar os possíveis benefícios das substituições dos resíduos de Arg<sup>1</sup> por Val<sup>1</sup> e Ser<sup>6</sup> por Thr<sup>6</sup> e as adições dos resíduos Val<sup>10</sup> e Asp<sup>11</sup> e Glu<sup>10</sup> e Ser<sup>11</sup> na porção C-terminal dos peptídeos. Foi avaliado se estas substituições alterariam a ação das serinoproteases, com a finalidade de potencializar o efeito hipotensor da Bk. Os análogos apresentaram vantagem sobre a Bk quando incubados com tripsina, pois a hidrólise foi favorável à ação deles por expor os resíduos Arg<sup>9</sup>, como discutido anteriormente, uma vez que a Bk teve sua ação reduzida. Quando incubados com quimotripsina, houve degradação tanto da Bk quanto dos análogos, impedindo a ação deles sobre o músculo liso. Estes dados em conjunto mostraram que a presença de serinoproteases em um mesmo sistema com a Bk e os análogos é capaz de aumentar ou reduzir a ação destes peptídeos sobre o músculo liso.

#### *Análise da relação entre a atividade e a estrutura de Bk e dos análogos*

O efeito ativo destes peptídeos era esperado, considerando a similaridade conformacional entre eles quando comparados à estrutura de análogos ativos, previamente analisados por dicroísmo circular. Brad e Ryan (1971), analisando a estrutura de Bk e análogos, por dicroísmo circular, observaram que análogos ativos apresentavam duas bandas com baixo sinal dicroico, uma negativa em

aproximadamente 234 nm, uma positiva em 221 nm e outra banda negativa em 210 nm. A presença da banda negativa em 210 representa estrutura desordenada dos peptídeos, enquanto que as bandas de máxima em 221 nm e mínima em 235 não estão correlacionadas com nenhum padrão de estrutura secundária do tipo ordenada, ou desordenada. No entanto, todos os peptídeos biologicamente ativos testados no trabalho apresentaram este perfil estrutural. Os espectros dicróicos da Bk e dos análogos (Figura 13) apresentaram banda positiva em 221 nm, que pode ser atribuída aos resíduos de fenilalanina presentes na estrutura dos peptídeos (Cann 1972; Cann 1983) e a banda dicróica negativa em 201 nm que indica predominância de estrutura desordenada. Estes perfis dicróicos que a Bk e os análogos apresentaram são consistentes com os estudos desenvolvidos por Brad e Ryan (1971). A semelhança dos espectros observada pode estar relacionada com os efeitos ativos, considerando que as conformações específicas dos peptídeos são necessárias para suas funções biológicas (Kotovych, 1998).

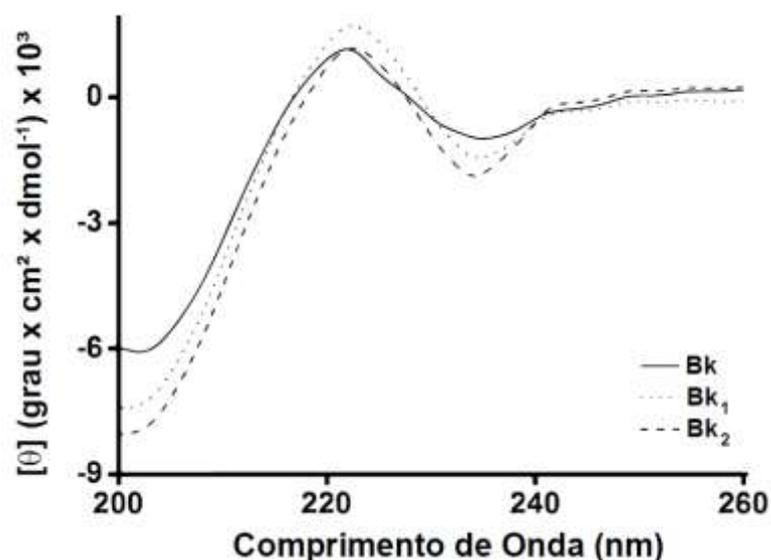


Figura 13. Espectros de dicróismo circular “distantes do UV” da Bk e análogos (Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>) em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C.

## Conclusões

A atividade proteolítica das serinoproteases, quimotripsina e tripsina, sobre a estrutura da Bk e dos análogos Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub> é favorecida por regiões presentes na estrutura primária destes peptídeos. A atividade proteolítica foi acompanhada por alterações estruturais nas serinoproteases de forma que elas, após interagirem com a Bk e com os análogos, ou não adotavam a conformação da estrutura inicial ou houve bloqueio do sítio ativo e isto induziu à redução da sua atividade. A atividade das serinoproteases sobre a Bk conduziu à redução significativa da ação sobre músculo liso de íleo de cobaia. Estes dados sugerem que a utilização de um inibidor de serinoproteases pode impedir ou pelo menos atenuar a hidrólise da Bk, deixando-a íntegra estruturalmente e ativa no sistema *in vivo*. Quanto aos dois análogos do estudo, foram resistentes à hidrólise enzimática por apresentarem um resíduo de Val na posição 1 substituindo o resíduo de Arg1 além da presença de dois resíduos a mais alongando o lado C-terminal. Isto confirma que os análogos formados por substituições e adições de resíduos de aminoácidos podem ser uma estratégia de regulação do metabolismo da Bk favorecendo o controle da sua atividade biológica.

## Referências Bibliográficas

- Appel, W. "Chymotrypsin: molecular and catalytic properties". *Clinical Biochemical*, v. 19 (6), p. 317–22, 1986. DOI: 10.1016/S0009-9120(86)80002-9. PMID 3555886.
- Brady, A. H.; Ryan, J. W. Circular Dichroism of Bradykinin and Related Peptides. *Biochemical Journal*, v. 121, p. 179-184, 1971.
- Cann, J. R. Circular Dichroism of Intramolecularly Hydrogen-Bonded Acetylamino Acid Amides? *Biochemical Journal*, v. 14, p. 2654 -2659, 1972.

- Cann, J. R. et al. A combined spectroscopic study of the solution conformation of bradykinin. *Advance Experimental Medicine and Biology*. v. 156, p. 495-500, 1983.
- Kotovych, G.; Cann, J. R.; Stewart, J. M.; Yamamoto, H. NMR and CD conformational studies of bradykinin and its agonists and antagonists: application to receptor binding. *Biochemical Cell Biology*, v. 76, p. 257-266, 1998.
- Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. *Springer*. Second edition, p. 698, 2004.
- Makinen, P. L.; Makinen, K. K.; Syed, S. A. Role of the chymotrypsin-like membrane-associated proteinase from *Treponema denticola* ATCC 35405 in inactivation of bioactive peptides. *Infection and Immunity*, v. 63, p. 3567-75, 1995.
- Nakashima, M.; Mombouli, J. V.; Taylor, A. A.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent Hyperpolarization Caused by Bradykinin in Human Coronary Arteries. *Journal Clinical of Investigation*, v. 92, p. 2867-2871, 1993.
- Polgár, L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 62, p. 2161–72, 2005. doi:10.1007/s00018-005-5160-x. PMID 16003488.
- Rawlings ND e Barrett AJ. "Families of serine peptidases". *Methods in Enzymology*, v. 244, p. 19–61, 1994. DOI :10.1016/0076-6879(94)44004-2. ISBN 978-0-12-182145-6. PMID 7845208.
- Regoli, D.; Barabe, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*, v. 32, p. 1—46, 1980.

## Seção II

### **Análise da ação de bradicinina e peptídeos análogos modulada pelo inibidor de serinoproteases BTCI**

#### *Análise da tendência de complexação entre o BTCI e Bk e análogos em solução*

A Bk e os análogos avaliados no presente estudo são potencialmente hidrolisados pelas serinoproteases tripsina e quimotripsina. A ação da quimotripsina resulta em redução da ação da Bk e dos análogos sobre o músculo liso. A ação da tripsina, reduz a ação da Bk sobre o músculo liso porém, sobre os análogos, favorece inicialmente a atividade de contração por expor os resíduos de Arg<sup>9</sup>, responsáveis por atuar nos receptores de Bk. Desta forma, as serinoproteases alteraram a estrutura primária da Bk e dos análogos. Nesta seção II foram analisados os resultados relacionados ao efeito do inibidor BTCI na degradação das estruturas destas moléculas bioativas por serinoproteases, quando presentes em uma mesma solução.

O BTCI em solução apresenta tendência, de forma espontânea, de formar estruturas multiméricas, por mecanismos de associação e dissociação (Ventura Mizuta, e Ikemoto, 1984; Silva et al, 2005). Como previamente publicado, a análise topográfica do BTCI em solução indicou a presença de componentes estruturais compatíveis, em volume, com monômeros, dímeros, trímeros e hexâmeros (Ventura, Mizuta e Ikemoto, 1984; Silva et al, 2005). Este processo de multimerização ocorre devido ao BTCI apresentar uma superfície heterogeneamente hidrofóbica, com parte dos seus resíduos de aminoácidos aromáticos, bem como outros resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, expostos ao solvente, o que torna favorável a formação de oligômeros mediante agregação, a partir de suas estruturas monoméricas, além de poder formar complexos com outras moléculas (Ventura, Mizuta e Ikemoto, 1984;

Silva et al, 2005). No presente trabalho, as dimensões hidrodinâmicas do BTCI na forma livre e associado com Bk e análogos foram estudadas por espalhamento de luz dinâmico (do inglês Dynamic Light Scattering, DLS).

DLS permite estudar interações entre moléculas, além de possibilitar a determinação das dimensões de moléculas, por meio de medidas dos parâmetros hidrodinâmicos. Os parâmetros investigados neste estudo foram o diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e *baseline*. A medida do diâmetro hidrodinâmico é obtida considerando que as partículas em análise são esféricas em movimento aleatório, apresentando diâmetro pequeno além da camada de solvatação. A polidispersividade permite analisar a tendência de formação de estruturas oligoméricas e/ou de aglomerados de proteínas, a possibilidade de formar cristais, bem como a pureza da amostra, quando considerada monodispersa. O valor de polidispersividade menor que 15% indica uma solução monodispersa (alta probabilidade da proteína ser cristalizada e pureza da amostra); menor que 30%, polidispersividade moderada e maior que 30% para quantidades significativamente polidispersas (baixa probabilidade da proteína ser cristalizada e presença de outras formas moleculares) (Borgsahl, 2007). O *baseline* é um parâmetro que classifica a amostra quanto à presença de diferentes formas moleculares como monomodal, bimodal ou multimodal. Uma solução monomodal, ou seja, contendo apenas uma forma molecular, apresenta valor *baseline* entre 0,997 e 1,002; bimodal, valores de *baseline* de 1,003 a 1,005, indicam a presença de duas formas moleculares; multimodal, valores de *baseline* acima de 1,005, indicando a presença de diversas formas moleculares (Borgsahl, 2007). A partir destas medidas, é possível estimar a presença de compostos diferentes ou homogêneos em uma solução, além de permitir a verificação da pureza da amostra.

Previamente às análises do BTCl na presença da Bk e dos análogos, foram realizadas medidas de cada uma destas moléculas separadamente. As medidas de DLS para Bk e os análogos indicaram formas monoméricas da Bk e dos análogos, na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , pH 7,4 e 37°C, apresentado um diâmetro hidrodinâmico de 1,0-1,2 nm (Figura 14). O valor da polidispersividade foi abaixo 15%, o que é compatível a uma solução monodispersa, além de indicar a pureza dos peptídeos em solução e sem a tendência de agregação (Borgsahl, 2007). O parâmetro *baseline* obtido foi 1,000, indicando a presença de somente uma forma molecular em solução.

Os valores encontrados de polidispersividade e *baseline* para os peptídeos caracterizam as soluções nas quais estão presentes como monodispersas e contendo uma única forma molecular, respectivamente. Os valores dos diâmetros hidrodinâmicos encontrados na solução contendo moléculas de BTCl confirmaram a presença de oligômeros em uma mesma solução (Figura 14B). Os monômeros de BTCl foram observados a baixa concentração (25  $\mu\text{M}$ ) com aproximadamente 1,6 nm de diâmetro hidrodinâmico enquanto a 100  $\mu\text{M}$  foram observadas as formas dimérica, trimérica e hexamérica, com diâmetro hidrodinâmico variando de 1,9 a 3,8 nm (Figura 14B). Estas formas multiméricas foram identificadas pelos valores da polidispersividade maiores que 30% e os valores do *baseline* de 1,007 (dados não mostrados).

O diâmetro hidrodinâmico do monômero de BTCl, após a adição de Bk e dos análogos, aumentou de 1,6 para 3,3 nm. Este aumento indica formação de complexos entre o inibidor e os peptídeos e que, possivelmente, mais de uma molécula de peptídeo associou-se com o inibidor (Figura 14C). Esta associação pode ter sido mediada e favorecida por forças hidrofóbicas, considerando os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos dos peptídeos e a superfície hidrofóbica do BTCl (Morhy

and Ventura, 1987; Ventura, Mizuta e Ikemoto, 1981; Ventura, Mizuta e Ikemoto, 1984; Freitas et al, 1997).

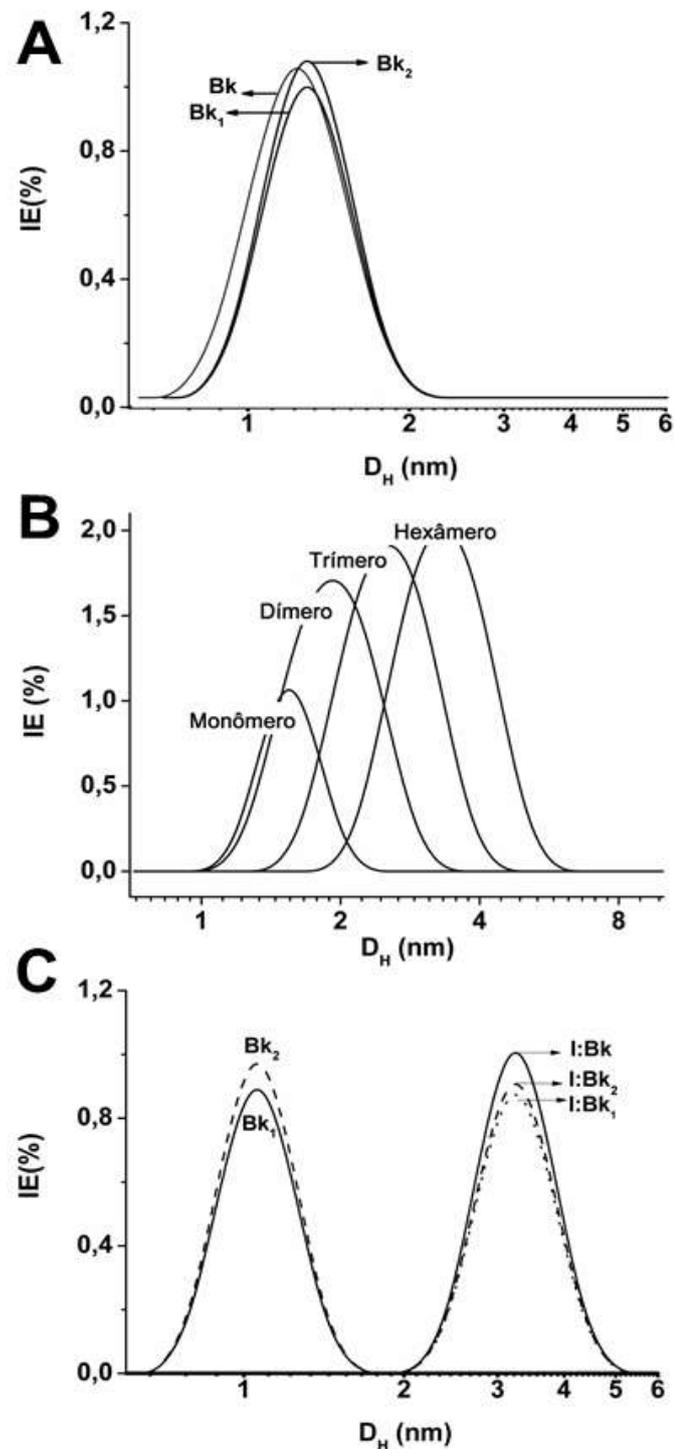


Figura 14. Medidas da Intensidade de Luz Espalhada por DLS, pelos peptídeos e pelo inibidor BTCI em função do diâmetro hidrodinâmico. Estados oligoméricos da Bk e dos análogos (25  $\mu$ M) (A), do BTCI (25  $\mu$ M) (B), dos complexos formados entre o inibidor e os peptídeos (25  $\mu$ M) (C) em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C.

A solução de BTCl, onde foi adicionada Bk, apresentou característica monomodal (*baseline* 1,001) e monodispersa (polidispersividade 10,67%), indicando a associação entre as duas moléculas. As soluções contendo BTCl e os análogos apresentaram polidispersividade moderada (23,39% e 22,67% para Bk<sub>1</sub>:BTCl e BK<sub>2</sub>:BTCl, respectivamente), indicando a presença de duas formas moleculares (1,004 para Bk<sub>1</sub>:BTCl e BK<sub>2</sub>:BTCl). Os valores dos diâmetros hidrodinâmicos das formas detectadas em solução, foram atribuídos aos análogos em complexo com o BTCl e não aos peptídeos complexados entre si.

#### *Análise da estrutura do BTCl após complexação com Bk e análogos*

Após confirmação dos complexos formados entre o BTCl e a Bk e BTCl e os análogos, as alterações da estrutura secundária do BTCl, em função da formação dos complexos, foram monitoradas e avaliadas por dicroísmo circular (DC). O perfil do espectro dicroico do BTCl permitiu a análise qualitativa da sua estrutura na presença da Bk e dos análogos. A figura 15 mostra um padrão do espectro dicroico do BTCl com banda intensa em aproximadamente 201 nm, mantido mesmo quando em complexo com a Bk e os análogos, porém com variação na intensidade das bandas dicroicas (Figura 15). O perfil obtido corrobora com o descrito por Ventura e Aragão (1978), com espectro distante do UV do BTCl nativo apresentando sinal dicroico em aproximadamente 201 nm. Este perfil caracteriza as moléculas que são predominantemente desordenadas e não helicoidais. A banda negativa em 201 nm foi também atribuída às ligações dissulfeto presentes na estrutura do inibidor, uma vez que após adicionarem o agente redutor ditioeritritol (DTE), essa banda dicroica deslocou para 199 nm (Ventura e Aragão, 1978).

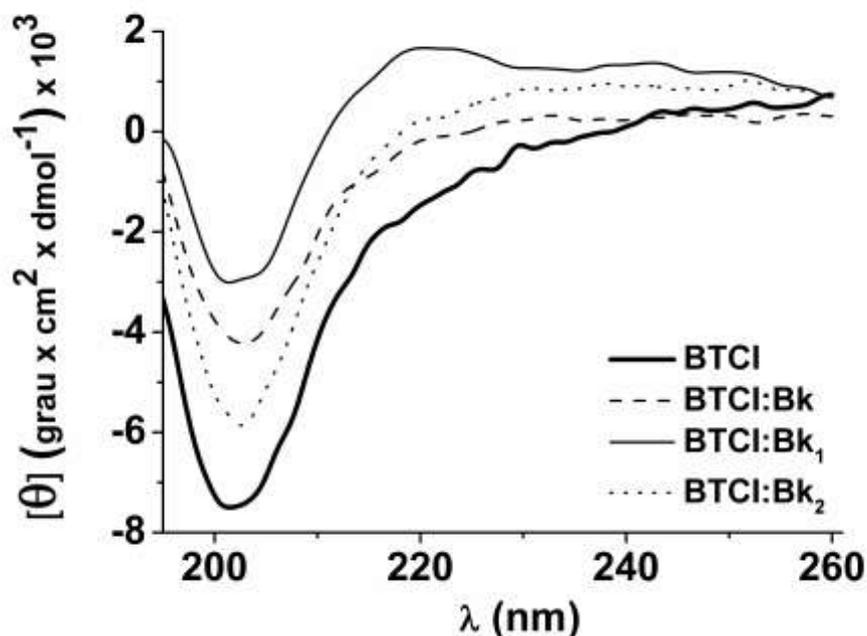


Figura 15. Espectros de dicroísmo circular “distantes do UV” do BTCl e complexos com a bradicinina (BTCl:Bk) e análogos (BTCl:Bk<sub>1</sub> e BTCl:Bk<sub>2</sub>) em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C.

**Tabela 2. Conteúdo de estruturas secundárias do BTCl e dos complexos BTCl : Bks**

Estrutura secundária (%)	BTCl	BTCl : Bk	BTCl : Bk <sub>1</sub>	BTCl : Bk <sub>2</sub>
α- hélice	11,6	11,1	12,6	14,7
β- antiparalela	17,4	21,0	46,7	30,0
β-paralela	22,0	19,0	5,4	16,5
Volta-β	22,1	23,2	21,9	21,4
Randômica	56,8	55,7	32,3	49,0

As estruturas secundárias foram calculadas utilizando o software CDNN deconvolution (Versão 2,1; Bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn) ( Böhm, Muhr e Jaenicke, 1992).

A variação de intensidade das bandas dicroicas observadas em 201 nm corresponde a modificações conformacionais na estrutura secundária do inibidor como consequência da associação à Bk e aos análogos. A quantificação das estruturas secundárias do inibidor em complexo à Bk e aos análogos (Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>) está apresentada na Tabela 2. O conteúdo das estruturas secundárias do BTCl está de

acordo com os valores previamente obtidos por dicroísmo circular e por infravermelho, com predominância de estruturas desordenada e folhas- $\beta$  (Ventura e Aragão, 1978).

O conteúdo das estruturas  $\beta$  antiparalelas foi aumentado consideravelmente na presença do análogo 1 que apresenta a extensão C-terminal contendo os resíduos Val e Asp. A presença deste resíduo carregado negativamente pôde ter contribuído para a dimerização do BTCl.

Quantitativamente, a Bk induziu menor alteração na estrutura secundária do BTCl do que os outros peptídeos, apesar de ter apresentado maior associação como mostrado por DLS e ensaios de ligação, discutidos a seguir.

#### *Alterações conformacionais do BTCl com Bk e análogos*

As alterações conformacionais ocasionadas na molécula do BTCl, em virtude da associação à Bk e aos análogos, foram confirmadas por meio da análise dos rearranjos moleculares monitorados a partir de ensaios espectrofluorimétricos (Figura 16). Estes rearranjos foram monitorados utilizando o fluoróforo do resíduo de triptofano presente na estrutura do BTCl. O BTCl apresenta um único resíduo de triptofano (Trp<sup>82</sup>) (Morhy e Ventura, 1987) o qual é, em grande parte, exposto ao solvente e domina o sinal de emissão de fluorescência da proteína, sendo uma estratégia para monitorar possíveis mudanças conformacionais do inibidor e o processo de ligação proteína-proteína (Ventura, Mizuta e Ikemoto, 1984).

O espectro de emissão de fluorescência do triptofano livre em solvente polar apresenta banda próxima em 340-350 nm, compatível com triptofano completamente exposto ao solvente (Laskowisk, 2006; Moler e Denicola, 2002). Exemplos de estudos fluorimétricos de proteínas de fontes diferentes, porém pertencentes a uma mesma

classe, mostram que, a partir de bandas de emissão do triptofano em comprimento de ondas distintos, diferenças conformacionais ou estruturais entre as proteínas podem ser evidenciadas. Duas proteínas distintas que apresentam bandas de emissão em 340 nm e 330 nm são compatíveis com ambiente do resíduo de triptofano exposto e enterrado, respectivamente. Medidas de atenuação de fluorescência realizadas a partir da titulação de iodeto de potássio,  $KI^-$  (carregado negativamente) em proteínas com resíduo de triptofano exposto, resultaram na constante de Stern-Volmer acima de  $8.0 M^{-1}$ , compatível com o resíduo de triptofano exposto ao solvente polar, podendo ser também um ambiente carregado positivamente. Em contraste, o valor da constante encontrado para proteínas com resíduo de triptofano enterrado é abaixo de  $8,0 M^{-1}$  o que indica que o iodeto de potássio não tem acesso ao ambiente do resíduo de triptofano por ele estar localizado no interior da proteína. Isto pode também ser explicado pelo impedimento eletrostático do  $KI^-$  em ambiente do triptofano representado por grupamentos carregados negativamente (Laskowisk, 2006; Moler e Denicola, 2002). Estas propriedades, identificadas por fluorescência, permitem o acompanhamento da formação de complexos moleculares, bem como a comparação de moléculas pertencentes a uma mesma classe, baseando no ambiente do resíduo de triptofano, que pode ser hidrofílico, hidrofóbico, carregado positivamente e carregado negativamente, sob o efeito de modificações do ambiente em estudo.

Utilizando o resíduo de triptofano intrínseco da estrutura do BTC1, o reposicionamento deste resíduo foi monitorado, com a adição de concentrações crescentes de Bk e dos análogos (25 a 500  $\mu M$ ). As medidas dos espectros mostraram supressão na intensidade de fluorescência emitida, resultante de rearranjos da molécula no microambiente do resíduo de triptofano, sem interferir no posicionamento deste resíduo. Isto foi observado por meio da equação de Stern-

Volmer que indicou alterações conformacionais na molécula do BTCl devido à Bk e aos análogos associarem-se a regiões próximas ao ambiente do resíduo Trp<sup>82</sup>, com banda de emissão em 355 nm (Figura 16).

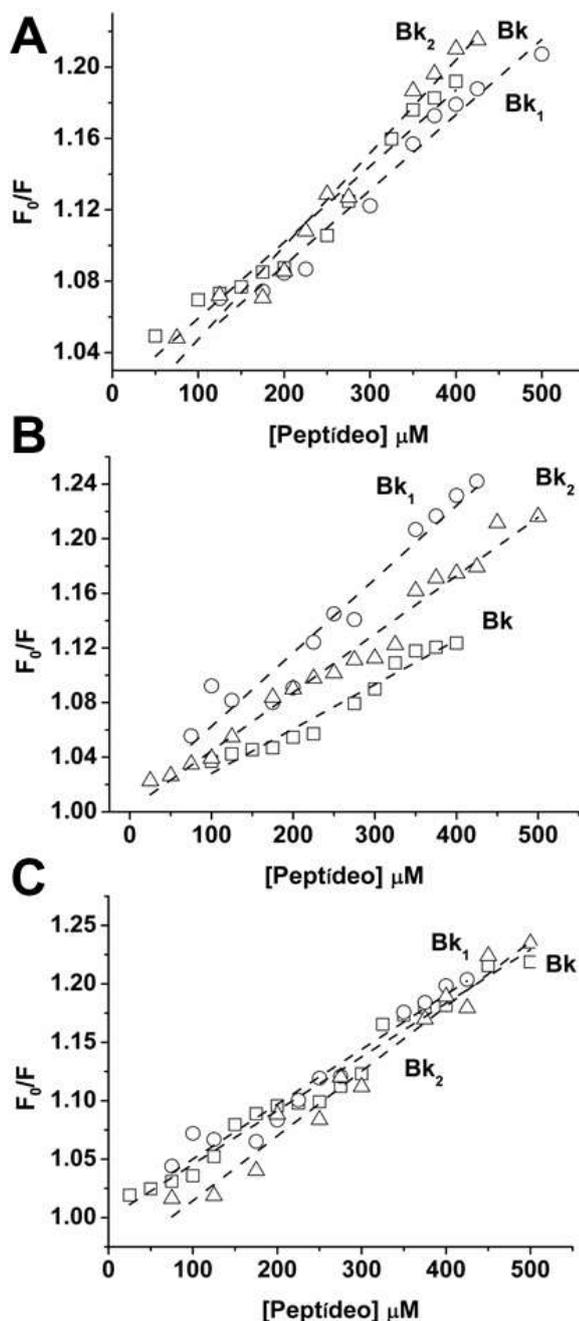


Figura 16. Gráfico de Stern-Volmer para a interação BTCl (25  $\mu\text{M}$ ) com concentrações crescentes de bradicinina e dos análogos (25  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$ ), em tampão Tris-HCl 2 mM pH 7,4 a 37°C. F0 e F são as intensidades de fluorescência do inibidor na ausência e presença da bradicinina/análogos, respectivamente. Bk está representada por quadrado, Bk<sub>1</sub> por círculo e Bk<sub>2</sub> por triângulo. A) pH 5,0 B) pH 7,4 C) pH 9,0.

A partir do espectro do BTCl, que apresentou intensidade máxima a 355 nm, foram registradas as demais intensidades de cada espectro, correspondendo a diferentes concentrações de Bk e dos análogos.

A partir destes registros, as constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) foram calculadas para analisar os rearranjos na molécula do BTCl (Figura 16). Adicionalmente, os dados obtidos pela supressão de fluorescência possibilitaram o cálculo das constantes de ligação ( $K_b$ ), o que permitiu analisar a afinidade entre o BTCl e a Bk e entre os análogos (Figura 17).

**Tabela 3. Constantes de Stern-Volmer dos complexos BTCl-Bks em diferentes pHs.**

Peptídeo	pH	$K_{SV} (x 10^2 M^{-1})$	$R^{2a}$	D.P. <sup>b</sup>
<b>Bk</b>	5,0	5,02	0,97	0,27
	7,4	5,53	0,97	0,30
	9,0	4,68	0,99	0,15
<b>Bk<sub>1</sub></b>	5,0	5,00	0,97	0,25
	7,4	4,82	0,97	0,26
	9,0	4,38	0,97	0,22
<b>Bk<sub>2</sub></b>	5,0	4,25	0,99	0,11
	7,4	5,09	0,97	0,28
	9,0	3,84	0,98	0,17

<sup>a</sup> $R^2$  é o coeficiente de correlação.

<sup>b</sup>D.P. é o desvio padrão para os valores de  $K_b$ .

As constantes de Stern-Volmer foram calculadas em função do pH, a partir da correlação linear obtidas do ajuste das curvas apresentadas na figura 16. Os valores das constantes (correspondentes à inclinação das retas) dos complexos BTCl:Bk, BTCl:Bk<sub>1</sub> e BTCl:Bk<sub>2</sub> estão apresentados na tabela 3.

A constante de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de ligação do BTCl ( $n$ ) para cada peptídeo foi calculada em função do pH. As constantes de ligação (Tabela 4) foram calculadas assumindo que as moléculas dos peptídeos podem se ligar de forma independente a sítios inespecíficos da macromolécula BTCl. Observadas as

condições utilizadas neste estudo, maiores alterações conformacionais na molécula do BTCl foram registradas em condições neutras e alcalinas.

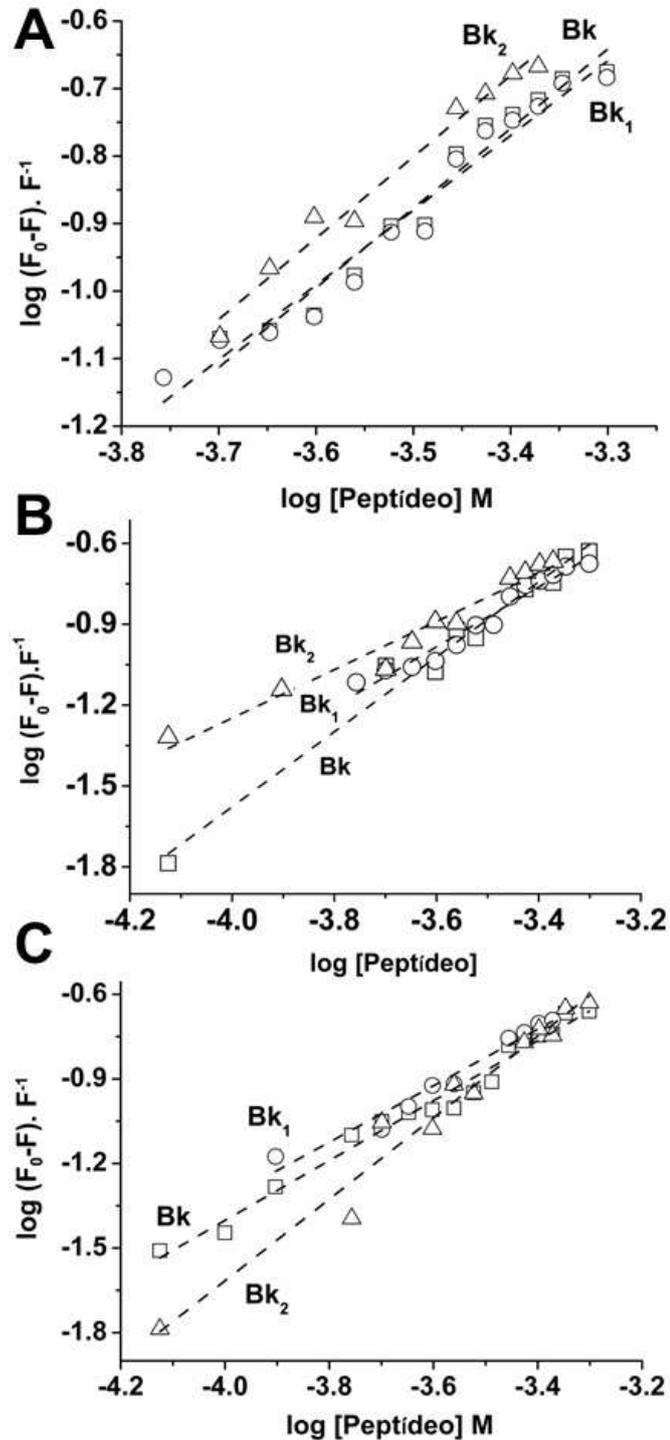


Figura 17.  $\log(F_0 - F)/F$  versus  $\log[\text{peptídeo}]$  do BTCl (25  $\mu\text{M}$ ) com concentrações crescentes de peptídeos (25 a 500  $\mu\text{M}$ ), em tampão Tris-HCl 2 mM a 37°C **A)** pH 5,0 **B)** 7,4 **C)** 9,0.  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência do inibidor na ausência e presença da bradicinina/análogos, respectivamente. A) pH 5,0 B) pH 7,4 C) pH 9,0.

O número de sítios de ligação ( $n$ ) do BTCl para Bk e análogos foi próximo de um (1,0) e semelhante em todos os valores de pH estudados, enquanto que as constantes de ligação foram distintas. O BTCl apresentou maior associação à Bk em pH 7,4 e ao análogo BK<sub>2</sub> em pH 9,0 (Tabela 4). Isto corrobora com os ensaios realizados por DLS, em que a Bk não foi observada na forma livre, quando em solução com o inibidor.

Estes resultados reforçam a hipótese de que BTCl pode ser utilizado como um potencial carreador para a Bk e os análogos na via sistêmica devido ao potencial de associação com essas moléculas, no intuito de proteger os peptídeos contra algum ataque proteolítico e garantir sua liberação no tecido alvo.

**Tabela 4. Constantes de ligação  $K_b$  e sítios de ligação ( $n$ ) dos complexos BTCl:Bks em diferentes pHs**

Peptídeo	pH	$K_b$ ( $\times 10^3 M^{-1}$ )	$n$	$R^2$ <sup>a</sup>	D.P. <sup>b</sup>
<b>Bk</b>	5,0	0,21	0,88	0,94	0,07
	7,4	9,68	1,39	0,98	0,07
	9,0	0,71	1,06	0,98	0,04
<b>Bk<sub>1</sub></b>	5,0	0,84	1,08	0,96	0,06
	7,4	1,02	1,11	0,96	0,06
	9,0	0,23	0,91	0,97	0,05
<b>Bk<sub>2</sub></b>	5,0	0,59	1,04	0,98	0,04
	7,4	0,22	0,89	0,96	0,06
	9,0	1,81	1,23	0,98	0,06

<sup>a</sup> $R^2$  é o coeficiente de correlação.

<sup>b</sup>D.P. é o desvio padrão para os valores de  $K_b$ .

#### *Análise da atividade do BTCl com Bk e análogos*

A proteção esperada para as estruturas da Bk e dos análogos pelo BTCl depende de sua atividade inibitória que não pode ser reduzida após a formação dos complexos, como comprovados anteriormente. Para esta análise foi estudada a atividade do BTCl na forma complexada à Bk e aos análogos, por meio de testes *in vitro*. Previamente, o BTCl foi testado contra as serinoproteases, tripsina e

quimotripsina, para fins de comparação com as amostras dos complexos. Os gráficos inseridos na figura 18 mostram, respectivamente, os ensaios inibitórios utilizando o BTCl sobre a tripsina e a quimotripsina. Estes resultados estão de acordo com aqueles reportados previamente em que os valores das constantes de inibição descritos na literatura para o BTCl contra as serinoproteases foram  $1,51 \times 10^{-8}$  M para tripsina e  $5,26 \times 10^{-6}$  M para quimotripsina (Ventura et al, 1966; Freitas, 1996).

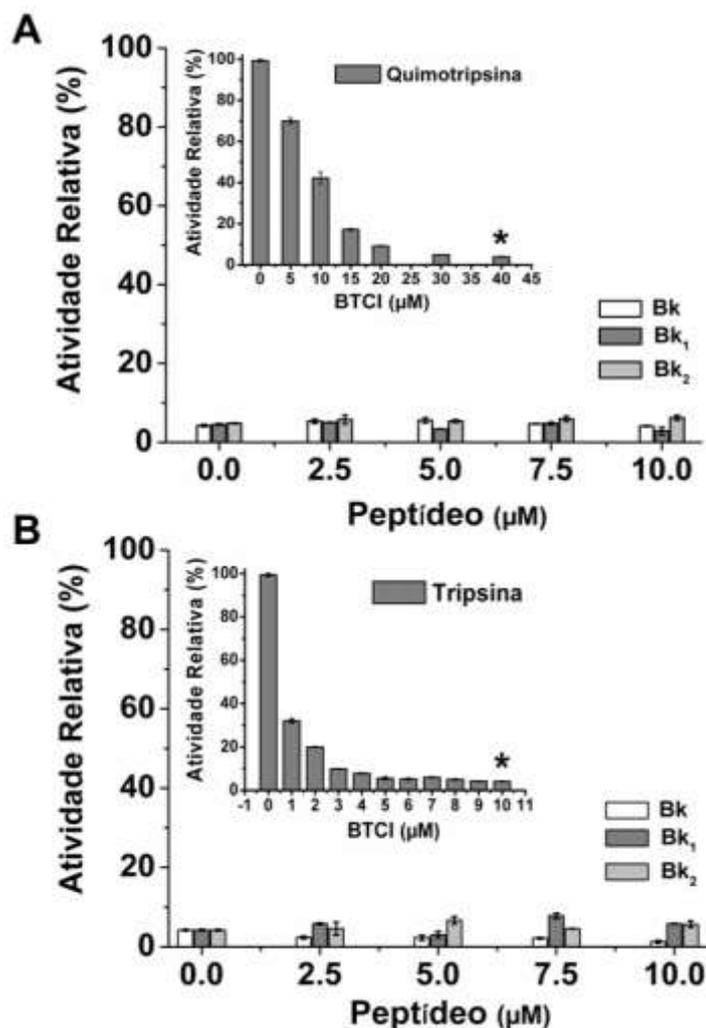


Figura 18. Atividade inibitória do BTCl para serinoproteases na presença de concentrações crescentes de bradicinina e dos análogos (0 a 10 µM). **A)** Atividade residual de quimotripsina na presença do inibidor a 40 µM na forma complexada aos peptídeos. **B)** Atividade residual de tripsina na presença do inibidor a 10 µM na forma complexada aos peptídeos.  $P < 0,05$  quando comparado com todos os outros na mesma concentração.

Para testar o BTCI na forma complexada à Bk e aos análogos (0 a 10  $\mu\text{M}$ ), foi utilizada a concentração determinada no ensaio anterior que inibe tripsina (10  $\mu\text{M}$ ) e quimotripsina (40  $\mu\text{M}$ ). A concentração utilizada de BTCI foi menor para tripsina devido apresentar maior eficiência de inibição contra esta protease como apresentado na figura 18.

A atividade inibitória do BTCI complexado não foi alterada, mantendo as propriedades dos sítios reativos desta proteína (Figura 18). Provavelmente, a bradicinina e os análogos associam-se ao BTCI em regiões distantes dos sítios ativos do inibidor e próximas ao resíduo Trp<sup>82</sup>, conforme discutido anteriormente. A manutenção da atividade do inibidor complexado, mesmo com as mudanças conformacionais discutidas, pode estar relacionada à independência entre os sítios reativos para a tripsina e quimotripsina, localizados em domínios opostos e independentes da molécula, e a presença de sete ligações dissulfeto, conferindo sua conformação estável com orientação favorável dos sítios reativos para ligação com as proteases (Barbosa et al, 2007 e Morhy e Ventura, 1987). Estes resultados mostraram que a Bk e seus análogos, quando se ligam ao BTCI, induzem mudanças conformacionais que não alteram a atividade inibitória do inibidor contra as serinoproteases, tripsina e quimotripsina. Isso é justificado pelo complexo formado entre eles sendo Bk e os análogos não envolvidos diretamente na interação do sítio inibitório do BTCI com a tríade catalítica das proteases. Entretanto é necessário analisar a influência dos complexos na atividade da Bk e dos análogos.

#### *Análise da ação de Bk e análogos sobre o músculo liso com BTCI*

A ação da Bk e dos análogos sobre o músculo liso foi avaliada quando complexados ao BTCI, utilizando preparações *ex vivo* de íleo de cobaias. O efeito de

contração do músculo liso pode ser monitorado devido ao íleo apresentar maior número de receptores do tipo B1 para Bk que do tipo B2, que promove dilatação. A Bk induziu contração considerável nas concentrações de 5,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ , na ausência do inibidor. Quando o BTCl foi incorporado ao sistema, a atividade aumentou por haver inibição das serinoproteases (Figura 19). Por outro lado, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> não mostraram qualquer efeito na presença do BTCl e serinoproteases. Como discutido na Seção I, a clivagem dos análogos por tripsina e a prevenção da clivagem por quimotripsina são fundamentais para aumentar a contração do músculo liso destes análogos. Na presença de BTCl, as atividades catalíticas de ambas as serinoproteases foram inibidas. Portanto, esta poderia ser uma estratégia para manter os peptídeos na forma inativa até que sejam apresentadas ao plasma e aos tecidos alvo. Esta pode ser uma possibilidade, uma vez que, as constantes de ligação obtidas para BTCl:Bks foram compatíveis com uma baixa afinidade, em que a dissociação dos complexos BTCl:Bks pode ocorrer em um eventual sistema de entrega.

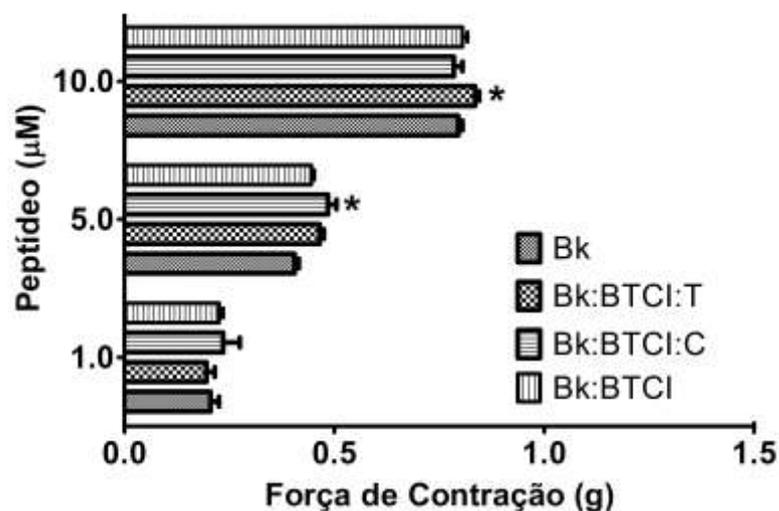


Figura 19. Ação da Bk sobre o músculo liso de íleo de cobaia (*Cavia porcellus*), na ausência e presença do BTCl. Não foram apresentados os valores para os análogos devido ao BTCl ter inibido a degradação deles pelas serinoproteases, não sendo possível o registro da força de contração (g).  $P < 0,05$ , comparado com a Bk à mesma concentração.

Estes resultados indicam que o BTCI pode atuar como um carreador para a Bk e os análogos, uma vez que não apresenta quaisquer alterações nas suas propriedades inibitórias, nem altera as propriedades da Bk sobre o músculo liso.

#### *Análise da ação cardiovascular e renal do BTCI com Bk e análogos*

A Bk é um peptídeo vasoativo que participa de numerosos processos inflamatórios, vasodilatação (Okamura e Toda, 1989). Holton e Holton, em 1952, demonstraram pela primeira vez um significativo aumento no conteúdo de sangue da orelha de coelho após a injeção intra-arterial de bradicinina, concluindo que este efeito foi causado por vasodilatação direta (Holton e Holton, 1952). Roche e Silva, 1952, mostraram a ação depressora pronunciada da Bk sobre a PAS, em uma variedade de animais (Rocha e Silva, 1952). Esta ação da Bk na PAS pode ser diminuída por ação de serinoproteases presentes no sangue e em tecido endotelial e rins. A supressão da atividade destas enzimas pelo BTCI pode favorecer o aumento de sua ação sobre a homeostasia.

Os efeitos cardiovasculares da Bk e seus análogos também foram avaliados no presente estudo, bem como associados com BTCI em testes *in vivo*. Os resultados são consistentes com os dados da literatura, que mostraram vasodilatação e hipotensão em respostas ao Bk (Rocha e Silva, 1952; Holton e Holton, 1952). Além disso, no presente estudo, foi observado também um efeito vasodilatador e conseqüente hipotensão promovida pelos peptídeos Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>.

Com a finalidade de investigar a hipótese de que o BTCI protege a Bk e os análogos da ação de serinoproteases, potencializando então indiretamente sua ação, os efeitos cardiovasculares da Bk e dos análogos, em associação com BTCI ou veículo (soro fisiológico 0,9%), foi avaliado por meio de ensaios *in vivo*. Infusões de

doses crescentes de BTCl (0,3, 3, 30 e 300  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.v.) foram feitas para padronização de uma dose ótima utilizada como um protetor dos peptídeos. A infusão de veículo não promoveu mudanças significativas na pressão arterial média (PAM) ( $-0,3 \pm 0,6$  mmHg em relação ao valor basal), na condutância vascular renal (CVR) ( $1,5 \pm 0,5$  bpm em relação ao valor basal) e na condutância vascular aórtica (CVA) ( $1,0 \pm 0,7\%$  em relação ao valor basal) (Figura 20).

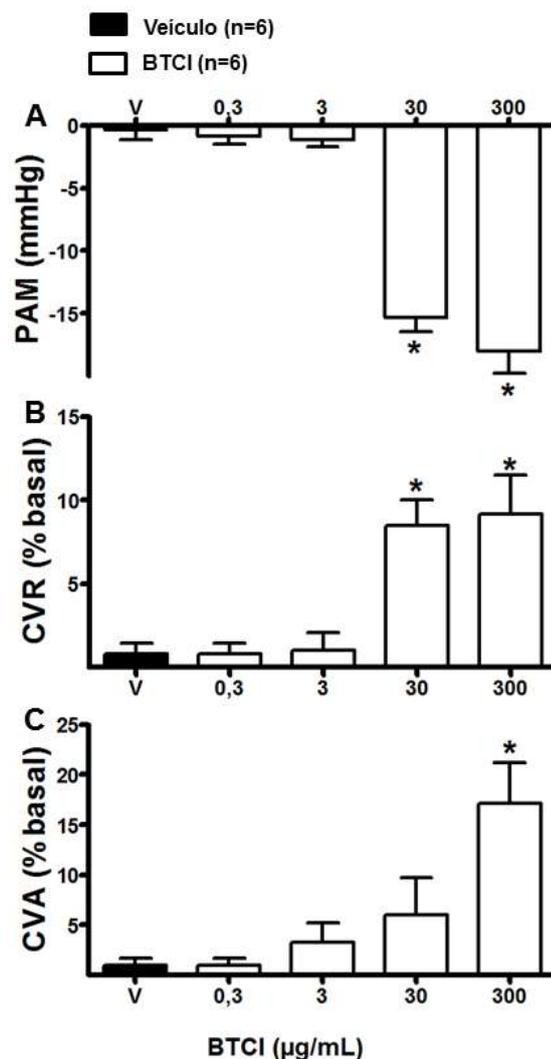


Figura 20. Efeitos hemodinâmicos induzidos por administrações intravenosas de BTCl (0,3, 3, 30 and 300  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  of b.wt, in 0,1 mL) ou Veículo (V; NaCl 0,9%) em ratos anestesiados. **A)** Pressão Arterial Média (PAM). **B)** Condutância Vascular Renal (CVR). **C)** Condutância Vascular Aórtica (CVA). Os resultados foram expressados como média de  $\pm$  SEM de 6 experimentos. \*  $P < 0,05$  comparado ao V.

As doses de BTCl 0,3 e 3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , não causaram alterações na PAM ( $-1 \pm 0,7$  e  $-1,5 \pm 0,5$  mmHg, respectivamente), CVR ( $1,5 \pm 0,2$  e  $2 \pm 1\%$ , respectivamente, em relação ao valor basal) e CVA ( $1 \pm 0,4$  e  $3 \pm 1,4\%$  respectivamente, em relação ao valor basal). As doses de 30 e 300  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  causaram alterações na PAM ( $-15 \pm 1,1$  e  $-18 \pm 1,8$  mmHg, respectivamente, em relação ao valor basal), CVR ( $8 \pm 1,6$  e  $9 \pm 3,4\%$ , respectivamente, em relação ao valor basal) e CVA ( $6 \pm 2,1$  e  $17 \pm 3,5\%$ , respectivamente, em relação ao valor basal) (Figura 20).

Em seguida, em outro grupo, as doses dos peptídeos (Bk, BK<sub>1</sub> e BK<sub>2</sub>; 120  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , iv), isolados e associados com BTCl (3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , iv), foram infundidos para testar seus efeitos sobre os parâmetros cardiovasculares. A infusão de veículo (0,9%), neste grupo, não promoveu mudanças na PAM ( $-0,3 \pm 0,3$  mmHg, em relação ao valor basal), CVR ( $1,5 \pm 0,4$  bpm, em relação ao valor basal) e CVA ( $1,0 \pm 1,7\%$  em relação ao valor basal) (Figura 8). A infusão intravenosa dos peptídeos produziu significativa hipotensão (Bk:  $-7 \pm 1,2$ ; BK<sub>1</sub>:  $-9 \pm 1,8$  e Bk<sub>2</sub>:  $-12 \pm 1,2$  mmHg, em relação ao valor basal), uma vasodilatação renal (Bk:  $9 \pm 2$ ; BK<sub>1</sub>:  $10 \pm 1,4$  e Bk<sub>2</sub>:  $19 \pm 3,0\%$ , em relação ao valor basal) e vasodilatação aórtica (Bk:  $9 \pm 1,6$ ; BK<sub>1</sub>:  $14 \pm 2,2$  e Bk<sub>2</sub>:  $19 \pm 2,7\%$ , em relação ao valor basal) (Figura 21).

A associação de Bk e Bk<sub>2</sub> com BTCl (3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , iv) não potencializou a hipotensão (Bk:  $-10 \pm 1,1$  e Bk<sub>2</sub>:  $-12 \pm 2,7$  mmHg, em relação ao valor basal), porém, potencializou a vasodilatação renal (Bk:  $12 \pm 1,1$  e Bk<sub>2</sub>:  $29 \pm 4,9\%$ , em relação ao valor basal) e vasodilatação aórtica (Bk:  $16 \pm 1,4$  e Bk<sub>2</sub>:  $28 \pm 2,6\%$ , em relação ao valor basal) (Figura 21). A associação de BK<sub>1</sub> com BTCl (3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , iv) não potencializou a hipotensão ( $-10 \pm 1,1$  mmHg, a partir do basal), a vasodilatação renal ( $11 \pm 1,4\%$  do veículo) e a vasodilatação aórtica ( $14 \pm 2,0\%$ , em relação ao valor basal) (Figura 21).

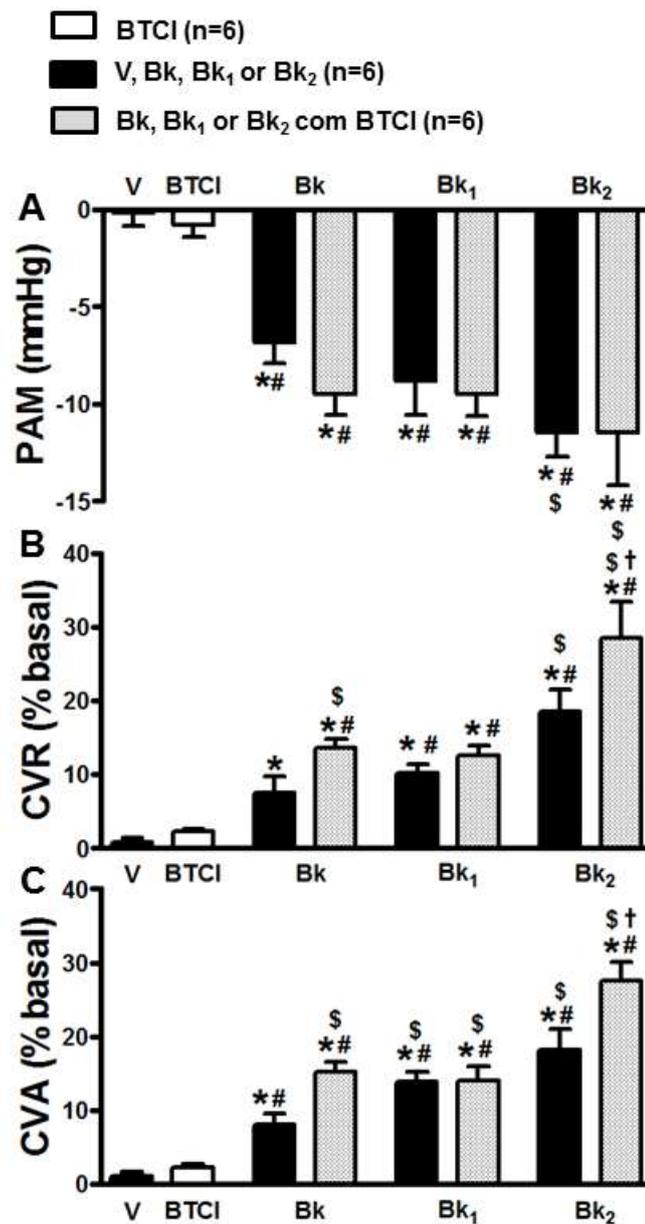


Figura 21. Efeitos hemodinâmicos da Bk e análogos na ausência e presença do BTCl. **A)** Pressão Arterial Média (PAM). **B)** Condutância Vascular Renal (CVR). **C)** Condutância Vascular Aórtica (CVA). \*P < 0,05 comparado ao veículo; # comparado ao BTCl, \$ comparado ao Bk; † comparado ao Bk<sub>2</sub>.

Estes resultados são consistentes com os dados da literatura que mostraram as respostas de vasodilatação e hipotensão para Bk (Carretero, 1991), sendo uma molécula de interesse para o controle da PAS. Além disso, no presente estudo, foram identificados peptídeos análogos à bradicinina, Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub>, que induzem o relaxamento

vascular e seus consequentes efeitos hipotensores. A disfunção endotelial está relacionada a um estado de hipertensão e a proteção do metabolismo da Bk pode favorecer sua ação sobre o músculo liso do endotélio (Nakamura e Prewitt, 1992). A associação do inibidor de protease, BTCl, potencializa a vasodilatação aórtica e renal induzida pelo peptídeo Bk, bem como pelo Bk<sub>2</sub>, mas estes efeitos não foram observados no Bk<sub>1</sub>, isso provavelmente se deve às diferenças na porção C-terminal entre ambos os peptídeos relacionados ao Bk. Nesse caso, o resíduo carregado negativamente na posição C-terminal de Bk<sub>1</sub> poderia dificultar a ação das proteases e consequentemente liberar mais lentamente o fragmento Bk ativo.

Em conjunto, os resultados demonstraram que os peptídeos relacionados com Bk, em especial Bk<sub>2</sub>, induziu uma redução da resistência vascular e consequente hipotensão nos animais avaliados no presente estudo, sugerindo um potencial terapêutico dos peptídeos relacionados ao Bk no tratamento da hipertensão. Estudos complementares deverão ser realizados em futuros estudos do grupo de pesquisa para elucidar as propriedades toxicológicas e o mecanismo de ação destes peptídeos.

## **Conclusões**

A degradação da Bk e dos análogos por serinoproteases pode ser reduzida por ação do inibidor de serinoproteases BTCl, com a finalidade de prolongar a meia-vida destes peptídeos na corrente sanguínea, favorecendo sua ação cardiofisiológica. Estes dados foram observados a partir do monitoramento da estrutura e função do BTCl na presença da Bk e dos análogos, por meio de técnicas espectroscópicas e fisiológicas. Estas técnicas permitiram observar e quantificar a associação entre o BTCl e os peptídeos, além de analisar a ação das moléculas presentes em um

mesmo sistema. Estes complexos foram favorecidos em condições alcalinas e neutras apresentando baixa afinidade ( $10^3$  a  $10^4$  M<sup>-1</sup>), o que pode contribuir para a liberação dos peptídeos no tecido alvo. Além disto, a associação entre as moléculas de estudo não reduziu a atividade inibitória do BTCl, nem a ação da Bk sobre o músculo liso de íleo de cobaia. Os testes *in vivo* realizados para a análise da ação hipotensora da Bk e dos análogos comprovaram que os complexos induziram redução da resistência vascular e consequente hipotensão. Neste estudo, foi demonstrado que o BTCl pode atuar como uma molécula empregável em estratégia para carrear e modular a atividade da Bk e os análogos em sistemas vivos, além de potencializar a ação hipotensora destas moléculas.

#### *Referências Bibliográficas*

- Barbosa, J. A.; Silva, L.P.; Teles, R.C.; Esteves, G.F.; et al. Crystal structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical Journal*, v. 92, p. 1638–1650, 2007.
- Bohm, G.; Muhr, R.; Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering*, v. 5, p. 191–195, 1992.
- Borgstahl, G.E.O. How to use Dynamic Light Scattering to improve the likelihood of growing macromolecular crystals. In *Macromolecular Crystallography Protocols. Methods in Molecular Biology*; Doublie, S., Ed.; *Humana Press Inc.*: Totowa, NJ, USA, 2007; Volume 363, pp. 109–130.

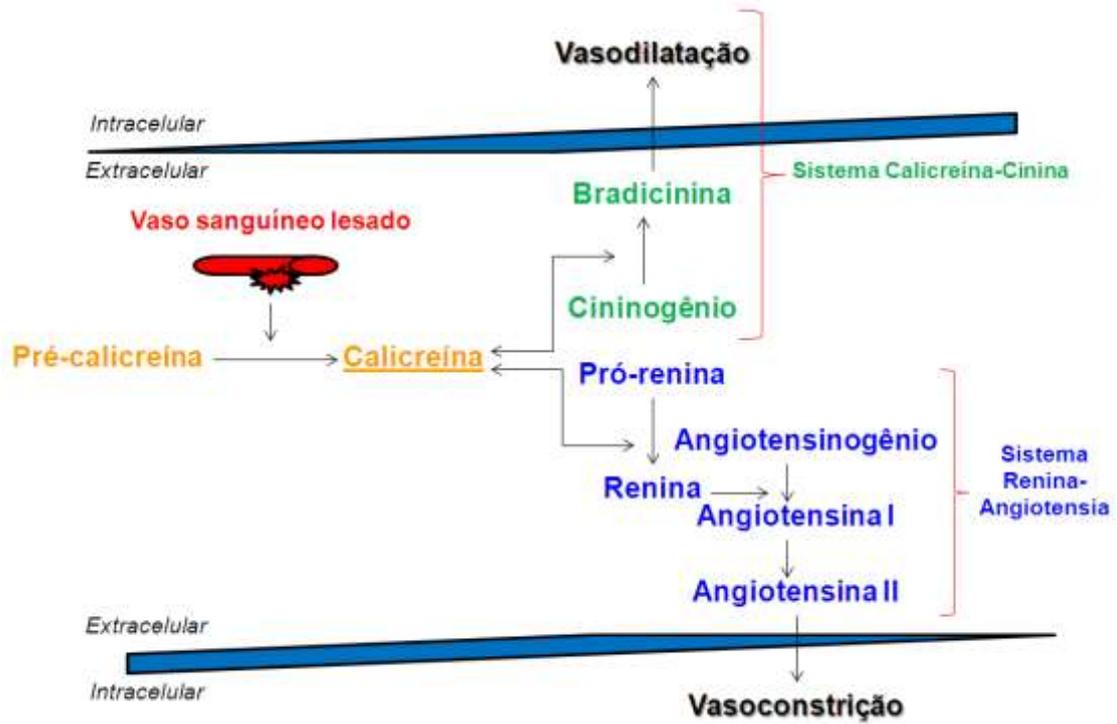
- Carretero, O.A.; Scicli, A.G. Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension*, v. 18, p. 58–69, 1991.
- Freitas, S.M. Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with  $\beta$ -Trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical Journal*, v. 92, p. 1638–1650, 2007.
- Freitas, S. M.; Mello, L. V.; Silva, M. C.; Vriend G.; et al. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. *FEBS Letters*, v. 409, p. 121-127, 1997.
- Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3<sup>a</sup> ed.; Springer: New York, NY, USA, 2006; Chapter 8, p. 698.
- Morhy, L.; Ventura, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) WaLP seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 59, p. 71–81, 1987.
- Nakamura, T.; Prewitt, R.L. Alteration of endothelial function in arterioles of renal hypertensive rats at two levels of vascular tone. *Journal Hypertension*, v. 10, p. 621– 627, 1992.
- Rocha e Silva M. Fundamentos da farmacologia e suas aplicações e terapêutica. São Paulo, *Edart*, 1969.
- Silva, L.P.; Azevedo, R.B.; Morais, P.C.; Ventura, M.M.; et al. Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. *Prot. Struct. Funct. Bioinform.*, v. 61, p. 642–648, 2005.
- Ventura, M. M.; Xavier-Filho, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and partial characterization, *Ann. Acad. Bras. Cienc.*, v. 38, p. 553–566, 1966.

- Ventura, M.M.; Aragão, J. B. The quenching of the Tryptophyl Fluorescence of the Black-eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor by Iodite and Cesium Ions – Effect of Adjacent Ionizable Groups. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, v. 49, 329-36, 1978.
- Ventura, M.M.; Mizuta, K.; Ikemoto, H. Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution. A study by light scattering. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v. 53, p. 195–201, 1981.
- Ventura, M. M. Mizuta, K.; Ikemoto, H. Solvent perturbation and surface accessibility of the tryptophyl and tyrosyl groups in black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* v. 56, p. 217-220, 1984.
- Okamura, T.; Toda, N. Different involvement of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin in vasodilator response to bradykinin in isolated dog blood vessels. *Adv Exp Med Biol.*, v. 247, p. 429-34, 1989.
- Holton, F.A. & Holton, P. The vasodilator activity of spinal roots. *J. Physiol. (Lond.)*, v. 118, p. 310-327, 1952.
- Holdstock, D.J.; Mathias, A.P. & Schachter, M. A comparative study of kinin, kallidin and bradykinin. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 12, p. 149-158, 1957.

**ANEXOS**

---

Representação esquemática da integração entre os sistemas Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) e o Caliceína-Cinina (KKS)



Article

## Bowman-Birk Protease Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds Enhances the Action of Bradykinin-Related Peptides

Alice da Cunha Morales Álvares <sup>1</sup>, Elisabeth Ferroni Schwartz <sup>2</sup>, Nathalia Oda Amaral <sup>3</sup>, Neidiane Rosa Trindade <sup>3</sup>, Gustavo Rodrigues Pedrino <sup>3</sup>, Luciano Paulino Silva <sup>4</sup> and Sonia Maria de Freitas <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biofísica, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília-UnB, Quadra 604, Asa Norte, Bloco J 1º andar, Brasília, DF 70910-900, Brazil; E-Mail: pharalice@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de Toxinologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília-UnB, Quadra 604, Asa Norte, Bloco J Térreo, Brasília, DF 70910-900, Brazil; E-Mail: efschwa@unb.br

<sup>3</sup> Center of Neuroscience and Cardiovascular Physiology, Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Estrada do Campus, Goiânia, GO 74690-900, Brazil; E-Mails: oda\_ufg@posgrad.ufg.br (N.O.A.); neidiane@posgrad.ufg.br (N.R.T.); pedrino@ufg.br (G.R.P.)

<sup>4</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Espectrometria de Massa, PBI, Parque Estação Biológica, Final W5 Norte, Asa Norte, Brasília, DF 70770-917, Brazil; E-Mail: luciano.paulino@embrapa.br

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nina@unb.br; Tel.: +55-61-3107-3101.

External Editor: Derek J. McPhee

Received: 4 September 2014; in revised form: 2 October 2014 / Accepted: 9 October 2014/

Published: 30 October 2014

---

**Abstract:** The hydrolysis of bradykinin (Bk) by different classes of proteases in plasma and tissues leads to a decrease in its half-life. Here, Bk actions on smooth muscle and *in vivo* cardiovascular assays in association with a protease inhibitor, Black eyed-pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI) and also under the effect of trypsin and chymotrypsin were evaluated. Two synthetic Bk-related peptides, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub>, were used to investigate the importance of additional C-terminal amino acid residues on serine protease activity. BTCI forms complexes with Bk and analogues at pH 5.0, 7.4 and 9.0, presenting binding

constants ranging from  $10^3$  to  $10^4$   $M^{-1}$ . Formation of BTCI-Bk complexes is probably driven by hydrophobic forces, coupled with slight conformational changes in BTCI. *In vitro* assays using guinea pig (*Cavia porcellus*) ileum showed that Bk retains the ability to induce smooth muscle contraction in the presence of BTCI. Moreover, no alteration in the inhibitory activity of BTCI in complex with Bk and analogous was observed. When the BTCI and BTCI-Bk complexes were tested *in vivo*, a decrease of vascular resistance and consequent hypotension and potentiating renal and aortic vasodilatation induced by Bk and Bk<sub>2</sub> infusions was observed. These results indicate that BTCI-Bk complexes may be a reliable strategy to act as a carrier and protective approach for Bk-related peptides against plasma serine proteases cleavage, leading to an increase in their half-life. These findings also indicate that BTCI could remain stable in some tissues to inhibit chymotrypsin or trypsin-like enzymes that cleave and inactivate bradykinin *in situ*.

**Keywords:** arterial blood pressure; bradykinin; Bowman-Birk inhibitor; circular dichroism; dynamic light scattering; fluorescence spectroscopy

---

## 1. Introduction

Bradykinin (Bk) is an endogenous biologically active peptide with nine amino acid residues (Arg<sub>1</sub>-Pro<sub>2</sub>-Pro<sub>3</sub>-Gly<sub>4</sub>-Phe<sub>5</sub>-Ser<sub>6</sub>-Pro<sub>7</sub>-Phe<sub>8</sub>-Arg<sub>9</sub>), which is physiologically cleaved from kininogen by serine proteases, such as kallikreins. Overall, the pharmacological activity of kinins is associated with many physiological and pathological processes and is also related to the renin-angiotensin system, blood coagulation and complementary pathways [1,2]. Non-mammalian bradykinin-related peptides, including those from amphibian, show primary structure differences, which are consistent with functional specificities. Thus, there is an increasing interest on the investigation of such peptides in comparison to the classic bradykinin.

Bradykinin and related kinins act in the constriction and vasodilatation of smooth muscle, as well as promoting arterial hypotension acting on two types of receptors, B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. Whereas B<sub>1</sub> receptors are barely expressed in normal tissues, being up-regulated after lesion and inflammation [3], B<sub>2</sub> receptors are responsible for most of the physiological effects of the kinins, including arterial vasodilatation, and peripheral smooth muscle contraction (stomach, colon, urinary bladder, uterus, and the ileum) [4,5]. *In vivo* hypotensive action results from vasodilatation by stimulation of endothelial B<sub>2</sub> receptors in arteries and arterioles, as well as from renal action in the natriuresis process [6–9]. Its hypotensive effect is decreased in plasma and tissues in the presence of kininases, such as the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) [10–12], metalloproteases [11] and chymotrypsin. In order to increase the half-life of Bk *in vitro* or in plasma and tissues, an association with protease inhibitors could be used as a rational strategy to prevent Bk enzymatic hydrolysis. Studies on the effects of ACE inhibitors showed that these molecules attenuate the progression of arteriosclerosis and the occurrence of cardiovascular events in humans [13]. In this context, protease inhibitors have been considered as one of the main pharmacological targets for cardiovascular treatment.

The huge interest in protease inhibitors has focused on natural inhibitors from different sources, particularly leguminous plants that are capable of regulating a number of relevant biological processes. These inhibitors belong to the well-characterized Bowman-Birk Inhibitor (BBI) and Kunitz-type inhibitor families [14]. In particular, BBI have been the most widely investigated molecules from the physicochemical, structural and functional points of view. BBIs play an important role in plant defense mechanisms against pathogens [15–17] and in various biological processes and therapeutic applications. They are involved in the inhibition of intracellular protein hydrolysis, in transcription and cell cycle, and cell invasion [18,19]. In addition, these inhibitors have also been described as anticarcinogenic agents acting on the prevention and suppression of cancer in several organs and tissues *in vitro* and *in vivo* [20–25].

The Black-eyed pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor (BTCI) is a member of the BBI family and was isolated from *Vigna unguiculata* seeds. This inhibitor is a stable globular protein consisting of 83 amino acid residues and seven disulfide bonds [26]. It presents two different reactive sites that interact simultaneously and independently with trypsin and chymotrypsin by forming binary and ternary stable complexes [27–29]. Furthermore, BTCI was characterized as the first member of the BBI family that elicited effects on renal function in rats [30]. BTCI enhanced guanylin-induced natriuresis response leading to an increase in urinary flow, in fractional excretion of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, in perfusion pressure, in glomerular filtration rate and allowing osmolar clearance. BTCI probably enhanced the natriuretic effects of this peptide through inhibition of its degradation by proteases present in this urinary system.

To date, no studies about the association of serine protease inhibitors, specifically those belonging to the BBI family and biologically active Bk, have been reported. However, studies regarding protease inhibitors from several sources generally focus on their effects on kallikreins by inhibiting the release of Bk from kininogen [1].

In the present study, we report the association of BTCI with classical bradykinin and its analogues and the protective action of BTCI against proteolytic degradation of Bk, as well as the effect of BTCI on their *in vitro* and *in vivo* hypotensive activities. The structural features of BTCI and its inhibitory activity, in the presence of classical Bk and two Bk analogues, were also investigated. The *in vitro* and *in vivo* experiments of Bk-related peptides in the presence or absence of BTCI *in vivo* were performed to assess smooth muscle contraction effects and cardiovascular responses induced by intravenous administration, respectively.

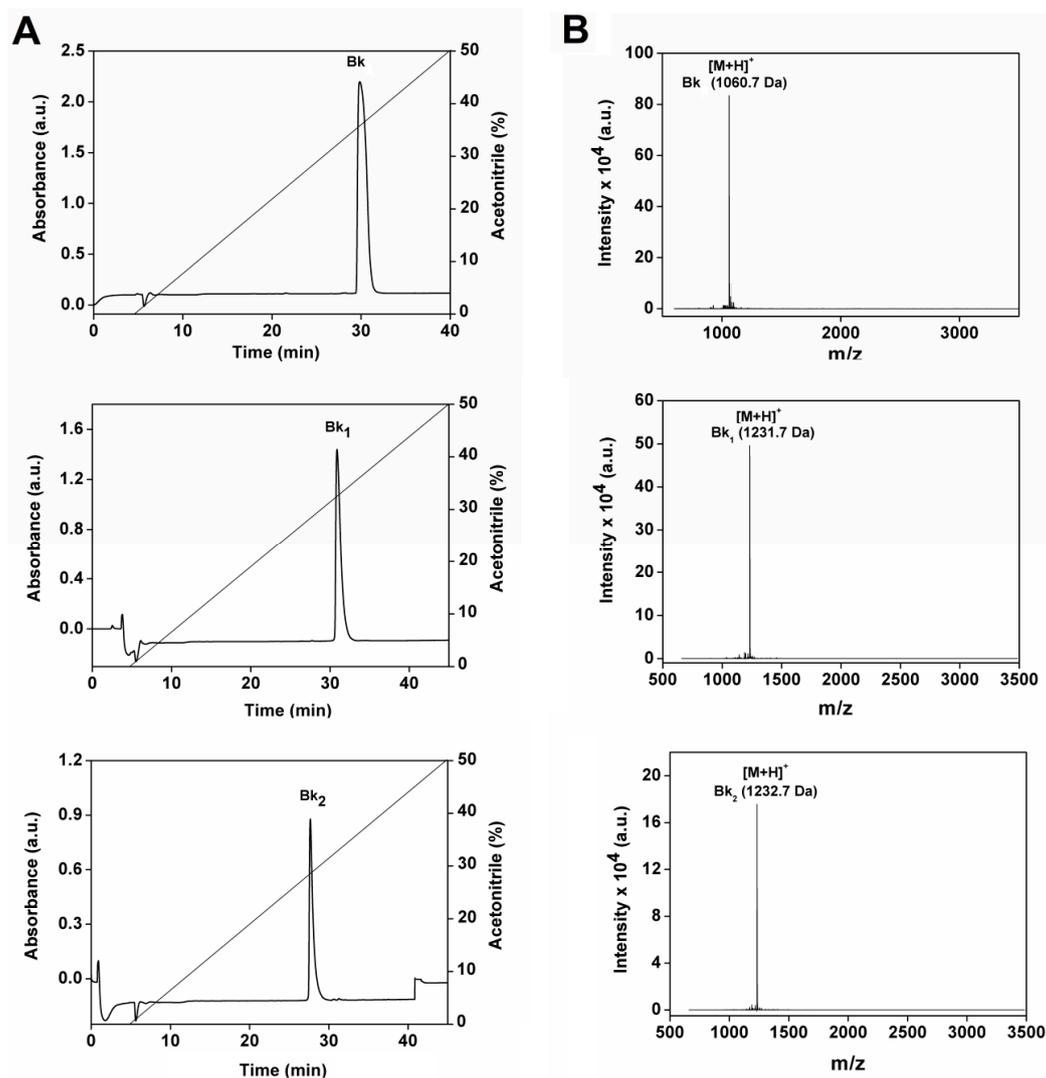
## 2. Results and Discussion

### 2.1. Synthesis and Purification of Bk and Bk-Related Peptides

Bk [Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>], Bk<sub>1</sub> [Val]<sup>1</sup>[Thr]<sup>6</sup>-bradykinyl-Val-Asp and Bk<sub>2</sub> [Val]<sup>1</sup>[Thr]<sup>6</sup>-bradykinyl-Gln-Ser (Table 1) were chemically synthesized and purified by semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC), as shown in Figure 1A. All peptides are relatively hydrophobic, as indicated by hydrophobic moment values shown in Table 1. The purity and molecular mass of three Bk-related peptides (Bk 1060.7 Da; Bk<sub>1</sub> 1231.7 Da and Bk<sub>2</sub> 1232.7 Da) were confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass

spectrometry (MALDI–TOF MS) analyses, as indicated by a single spectrum obtained for each peptide (Figure 1B). The pretreatment *in vitro* of Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> with trypsin release the active Bk fragment as assessed by HPLC and mass spectrometry (data not shown).

**Figure 1.** Purification of the synthetic peptides Bk, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub>. (A) Reverse-phase chromatography C<sub>18</sub> Vydac 218 TP 510 column using a linear gradient (5%–95%) of acetonitrile (ACN); (B) MALDI–TOF mass spectrometry analysis of synthetic peptides Bk, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> identified by the legend.



**Table 1.** Amino acid sequences of the bradykinin and analogues.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	M.M. (Da)	I.P.	H.M.
Bk	Bradykinin	R	P	P	G	F	S	P	F	R	---	---	1060.7	12.0	1.195
Bk <sub>1</sub>	Val,[T] <sup>6</sup> -bradykinyl-Val,Asp	V	P	P	G	F	T	P	F	R	V	D	1231.7	5.8	1.450
Bk <sub>2</sub>	Val,[T] <sup>6</sup> -bradykinyl-Glu,Ser	V	P	P	G	F	T	P	F	R	Q	S	1232.7	9.7	2.443

Notes: M.M. is the Molecular Mass; I.P. is the Isoelectric Point; H.M. is the Hydrophobic Moment.

## 2.2. BTCI and Bk Complex Formation Investigated by Dynamic Light Scattering (DLS)

The hydrodynamic diameters of 1.0–1.2 nm indicate that Bk and analogues appear as monomers at 25  $\mu\text{M}$ , pH 7.4 and 37  $^{\circ}\text{C}$  (Figure 2A). The recorded polydispersity was lower than 0.15, which is compatible with a monodisperse system and purity of Bk and analogues in solution. This result also indicates that peptides do not present tendency to aggregate [31]. Nevertheless, BTCI appeared as a monomer at low concentration (25  $\mu\text{M}$ ), with approximately 1.6 nm hydrodynamic diameter, whereas at 100  $\mu\text{M}$  it self-assembled into dimer, trimer, and hexamer (Figure 2B), with hydrodynamic diameter ranging from 1.9 to 3.5 nm. These results corroborated those previously reported, indicating the self-association of BTCI in different multimeric states, when in solution [32] or air-dried [33]. These multimeric states contributed to the observed polydispersity, which was greater than 0.3, compatible with oligomeric states of this molecule in solution. This process is favored by the hydrophobic surface of BTCI, which consists of several hydrophobic amino acid residues exposed to the solvent [28,29,34].

**Figure 2.** DLS size distribution (hydrodynamic diameter,  $D_H$ ) of Bk and its analogues (A), BTCI (B) and the BTCI-Bk-related peptide complexes (C).

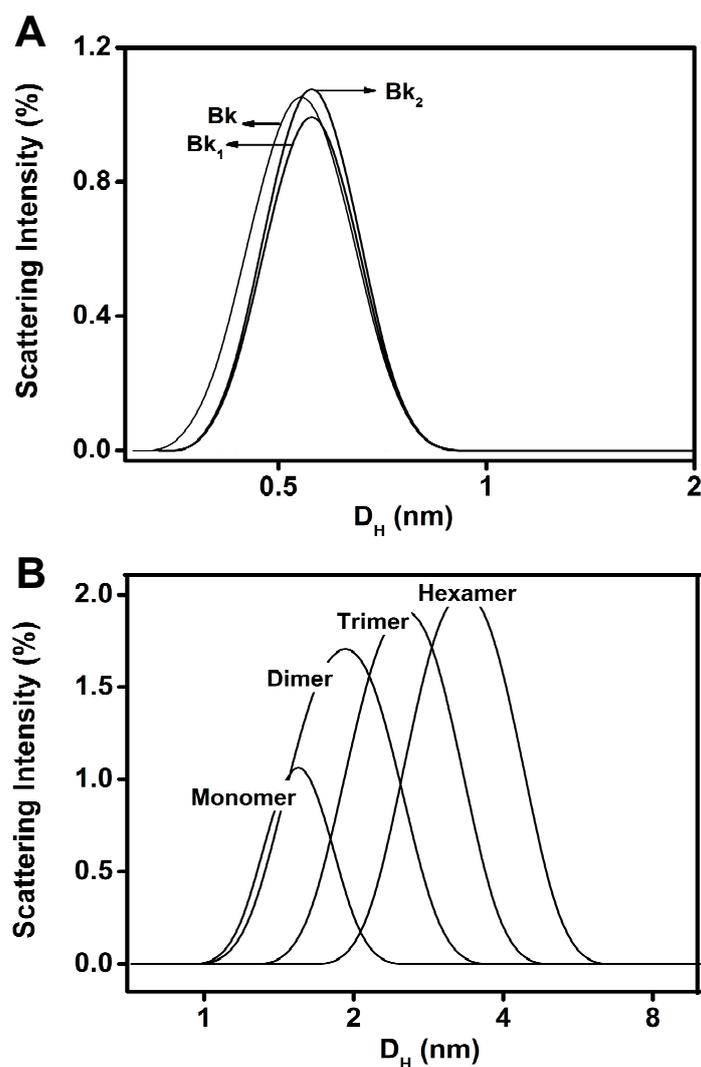
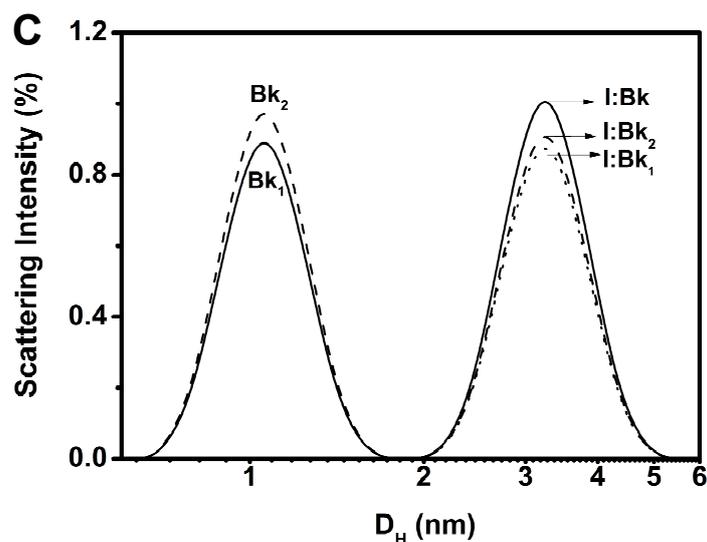


Figure 2. Cont.



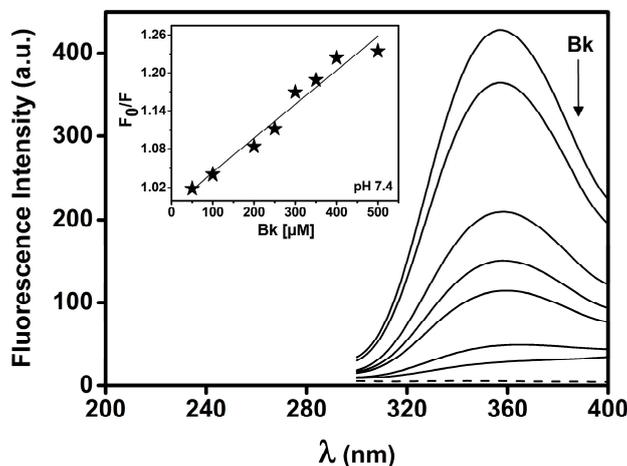
Bk, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> presented a hydrodynamic diameter ( $D_H$ ) of 1.0–1.2 nm (Figure 2A) with polydispersity lower than 0.15 (monodisperse solution). BTCI is observed as a monomer at low concentrations (25  $\mu$ M), and as a dimer, trimer and hexamer, in higher concentrations (100  $\mu$ M) (Figure 2B), with a polydispersity above 0.3. The hydrodynamic diameter of BTCI in the presence of Bk, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> increased from 1.7 nm to 3.3 nm (Figure 2C). In addition, the BTCI-Bk complex formation was also indicated by the monodispersivity feature (polydispersity of 0.107) and the hydrodynamic diameter of about 3.3 nm, compatible with the dimensions of both associated molecules (Figure 2C). The monodispersity of Bk-BTCI complex and the moderate polydispersity of Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> complexed with BTCI indicates that these peptides bind to BTCI in different ways.

### 2.3. Structural Analysis of BTCI and BTCI-Bk-Related Peptide Complexes by Fluorescence Spectroscopy

BTCI (25  $\mu$ M) in complex with Bk and analogues were evaluated by fluorescence quenching within the concentration of peptides range of 25–500  $\mu$ M. Addition of increasing concentrations of peptides caused a progressive decrease in fluorescence intensity, as shown for Bk in Figure 3. According to Stern-Volmer adjustment, a linear correlation is noted in the fluorescence emission at 355 nm (Figure 3, inset), consistent with a quenching occurring due to the static process and protein-protein complex formation. The Stern-Volmer constants ( $K_{sv}$ ), obtained at pH 5.0, 7.4 and 9.0 are shown in Table 2.

The binding constant ( $K_b$ ) and the number of binding sites per BTCI molecule ( $n$ ), of each Bk-related peptide association, as a function of pH, were calculated from fluorescence quenching at pH 5.0, 7.4 and 9.0. However, only the binding assay for Bk, analogues and BTCI at pH 7.4 is highlighted (Figure 4). The binding constants at different pHs (Table 3) were calculated assuming the equilibrium between free and bound small molecules that can bind independently to a set of equivalent sites in a single macromolecule. The high correlation coefficients and low standard deviations indicated that the results derived from Equation (3) (see methods) are satisfactory.

**Figure 3.** Fluorescence quenching of BTCI in complex with Bk at pH 7.4. Increasing concentrations of Bk (25 to 500  $\mu\text{M}$ ), indicated by arrow, lead to progressive reduction of Trp<sup>82</sup> fluorescence intensity of BTCI. The inset shows a Stern-Volmer plot to obtain the  $K_{\text{SV}}$  values.

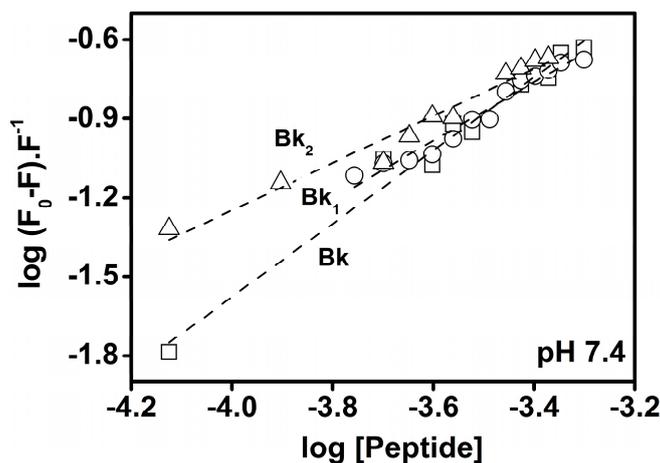


**Table 2.** Stern-Volmer quenching constants ( $K_{\text{SV}}$ ) of the BTCI in complex with Bk, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> at different pHs.

Peptide	pH	$K_{\text{SV}} (\times 10^2 \text{ M}^{-1})$	$R^{2a}$	S.D. <sup>b</sup>
Bk	5.0	5.02	0.97	0.27
	7.4	5.53	0.97	0.30
	9.0	4.68	0.99	0.15
Bk <sub>1</sub>	5.0	5.00	0.97	0.25
	7.4	4.82	0.97	0.26
	9.0	4.38	0.97	0.22
Bk <sub>2</sub>	5.0	4.25	0.99	0.11
	7.4	5.09	0.97	0.28
	9.0	3.84	0.98	0.17

Notes: <sup>a</sup> Correlation coefficient; <sup>b</sup> Standard deviation.

**Figure 4.** The plots of  $\text{Log}(F_0 - F)/F$  vs.  $\text{Log}[\text{Peptide}]$  for quenching of BTCI by Bk-related peptides, at pH 7.4.



**Table 3.** Binding constants  $K_b$  and binding sites ( $n$ ) of BTCI in complex with Bk, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> at different pHs.

Peptide	pH	$K_b$ ( $\times 10^3$ M <sup>-1</sup> )	$n$ <sup>a</sup>	$R$ <sup>2b</sup>	S.D. <sup>c</sup>
Bk	5.0	0.21	0.88	0.94	0.07
	7.4	9.68	1.39	0.98	0.07
	9.0	0.71	1.06	0.98	0.04
Bk <sub>1</sub>	5.0	0.84	1.08	0.96	0.06
	7.4	1.02	1.11	0.96	0.06
	9.0	0.23	0.91	0.97	0.05
Bk <sub>2</sub>	5.0	0.59	1.04	0.98	0.04
	7.4	0.22	0.89	0.96	0.06
	9.0	1.81	1.23	0.98	0.06

Notes: <sup>a</sup> number of site; <sup>b</sup> correlation coefficient; <sup>c</sup> standard deviation.

#### 2.4. Secondary Structure and Inhibitory Activity of BTCI in the Presence of Bk-related Peptides

The conformational changes of Bk and analogues, BTCI free and in complex with peptides at pH 7.4 were evaluated by circular dichroism (CD). Far-UV CD spectra of Bk and its analogues (Figure 5A) are similar. Two weak dichroic bands, a negative one at 235 nm and a positive one at 220 nm, and an intense negative band at 210 nm indicate the peptides are in an unordered structure. The significance of maximum bands around 220 nm and minima around 235 nm is unknown, but most of the biologically active Bk-related peptides showed this dichroic profile [35–37]. Far-UV CD spectra of BTCI and BTCI in the presence of the Bk-related peptides were also similar presenting dichroic bands around 200 nm. However, they presented a small difference in molar ellipticity intensity (Figure 5B), consistent with small changes in the secondary structure content of BTCI (Table 4).

The insets in Figure 6A,B show the inhibitory assays of BTCI against trypsin and chymotrypsin, respectively, as previously reported [38,39]. BTCI was highly active against bovine pancreatic trypsin at concentrations ranging from 0 to 10  $\mu$ M, inhibiting about 100% of proteolytic activity at 10  $\mu$ M (Figure 6A, inset). BTCI was also highly active against bovine chymotrypsin, inhibiting approximately 100% of its proteolytic activity at 40  $\mu$ M (Figure 6B, inset).

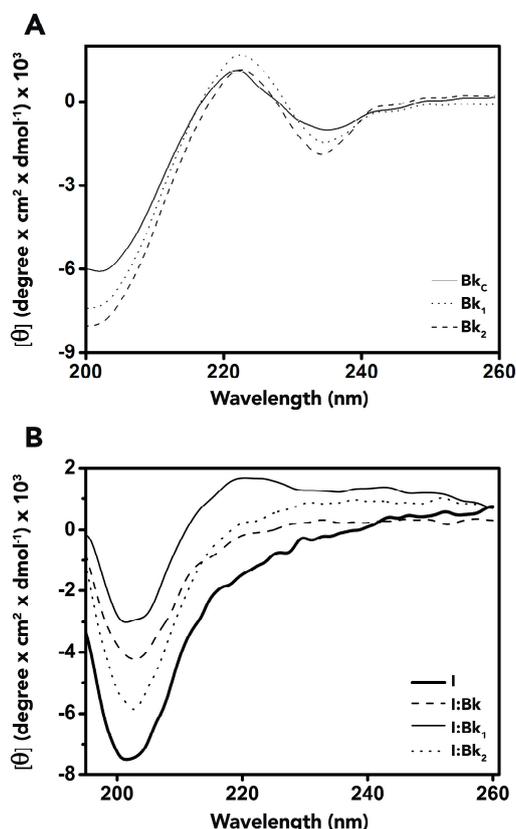
The inhibitory activities of BTCI at concentrations in which it showed ~100% of protease inhibition (10  $\mu$ M for trypsin and 40  $\mu$ M for chymotrypsin) in the presence of increasing concentrations of Bk-related peptides (0–10  $\mu$ M) were very similar (Figure 6A,B). Bk enhanced BTCI inhibition activity against trypsin and chymotrypsin, whereas Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> did not interfere in their activities.

**Table 4.** Secondary structure contents of the BTCI and BTCI-Bk complexes.

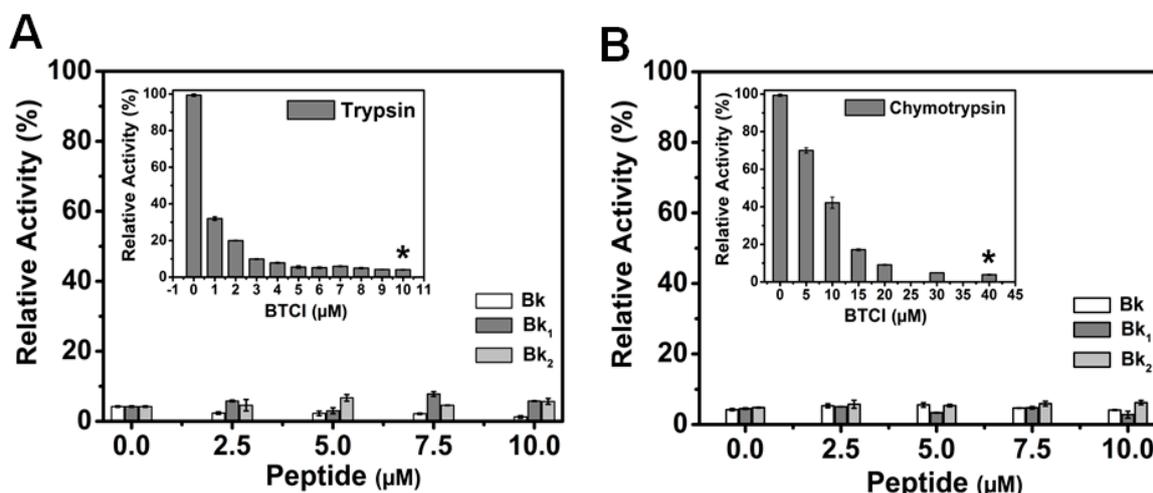
Secondary Structure (%)	BTCI	BTCI-Bk	BTCI-Bk <sub>1</sub>	BTCI-Bk <sub>2</sub>
$\alpha$ -helix	11.6	11.1	12.6	14.7
$\beta$ -antiparallel	17.4	21.0	46.7	30.0
$\beta$ -parallel	22.0	19.0	5.4	16.5
$\beta$ -turn	22.1	23.2	21.9	21.4
Random coil	56.8	55.7	32.3	49.0

Notes: The secondary structures were calculated using the CDNN deconvolution software (Version 2.1, Bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdmn) [40].

**Figure 5.** Far-UV Circular dichroism (CD) spectra of Bk-related peptides, BTCI and their complexes. **(A)**. CD spectra of Bk, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> show a negative dichroic band at 235 nm, a positive band at 221 nm and a negative band at 210 nm; **(B)**. CD spectra of the complexes between Bk-related peptides and BTCI showing differences in the molar ellipticity intensity of the bands.



**Figure 6.** Trypsin and chymotrypsin activity in the presence of BTCI complexed with Bk and its analogues. **(A)** BTCI at 10 μM was set as the standard concentration to inhibit trypsin activity (inset); **(B)** BTCI at 40 μM was set as the standard concentration to inhibit chymotrypsin activity (inset). \* *p* < 0.05 is compared with all other peptides at the same concentration.



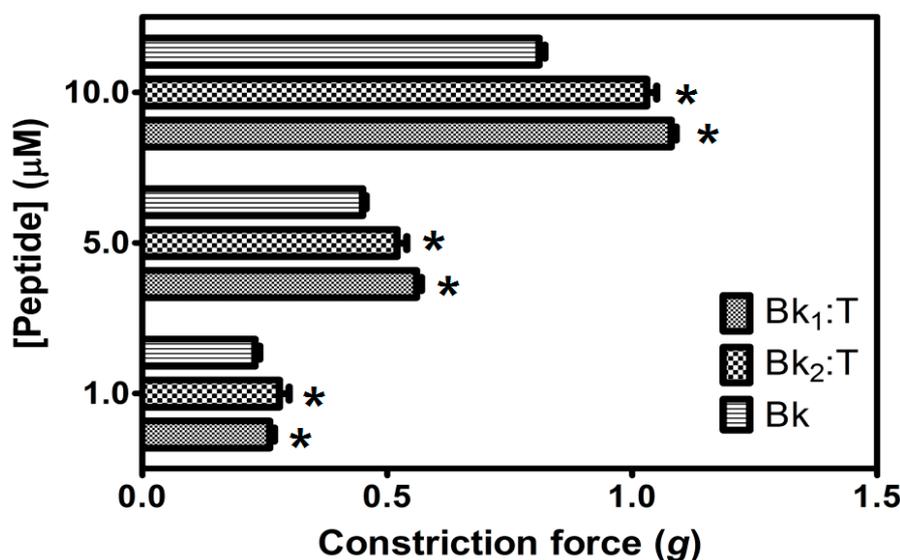
### 2.5. Modulation of Smooth Muscle Contraction Action of Bk Mediated by BTCI

The action of Bk and its analogues on smooth muscle was evaluated when they were in complex with BTCI, using guinea pig ileum preparations, a well-characterized smooth muscle contraction assay, sensitive to Bk. It is worth mentioning that B<sub>2</sub> receptors in rat and guinea pig tissues belong to a similar pharmacological entity [4], so the vasodilatation observed in rat aorta experiments is related to the guinea pig ileum contraction, mediated through the same B<sub>2</sub> subtype receptor.

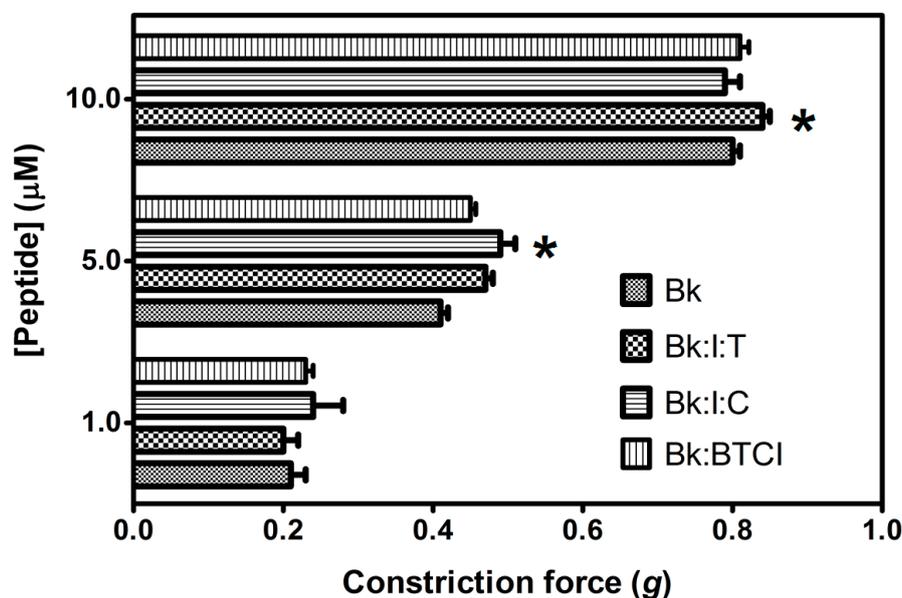
As shown in Figures 7 and 8, different concentrations of Bk up to 10 µM were able to induce smooth muscle contraction in a concentration-responsive manner. However, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> were unable to exert their contractive effects, suggesting that further structural processing for interaction with B<sub>2</sub> receptors or a higher dose than that used in the present assay are necessary.

When pretreated with trypsin prior to application on guinea pig ileum, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> were cleaved on Arg<sup>9</sup>-Val<sup>10</sup> and Arg<sup>9</sup>-Gln<sup>10</sup> and induced smooth muscle contraction, in a concentration-responsive manner (Figure 7), and at higher levels than Bk in free state, highlighting the importance of Arg<sup>9</sup> for B<sub>2</sub> receptor interaction. The action of Bk was evaluated in presence of BTCI and serine proteases to analysis if this inhibitor can influence the contraction on smooth muscle (Figure 8). Presence of BTCI slightly increased the smooth muscle contraction induced by Bk at 5.0 µM, and at 10.0 µM it was observed the same effect only when BTCI inhibited trypsin. From data present in Figure 8, we can observe that the effect of Bk was not affected by its association with BTCI, neither by the presence of serine proteases. Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> did not induce muscle contraction when pretreated with BTCI and serine proteases (data not shown). Contrary to *in vitro* results, the active fragments of Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> could be produced by the action of proteases *in vivo*. This could explain the reported *in vivo* hypotensive effects of such peptides.

**Figure 7.** Smooth-muscle constriction force assay of Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> in different concentrations (1.0, 5.0 and 10.0 µM), in guinea pig ileum smooth-muscle. \*  $p < 0.05$  is compared with all other peptides at the same concentration.



**Figure 8.** Smooth-muscle constriction assay of Bk in free state (Bk), complexed with BTCI (Bk:I), and complexed with trypsin (Bk:I:T) and chymotrypsin (Bk:I:C). Bk in different concentrations (1.0, 5.0 and 10.0  $\mu\text{M}$ ) was used to evaluate the induced contraction force in guinea pig ileum smooth-muscle \*  $p < 0.05$  is compared with all other peptides at the same concentration.



### 2.6. Cardiovascular Effects of the Infusion of BTCI or Vehicle

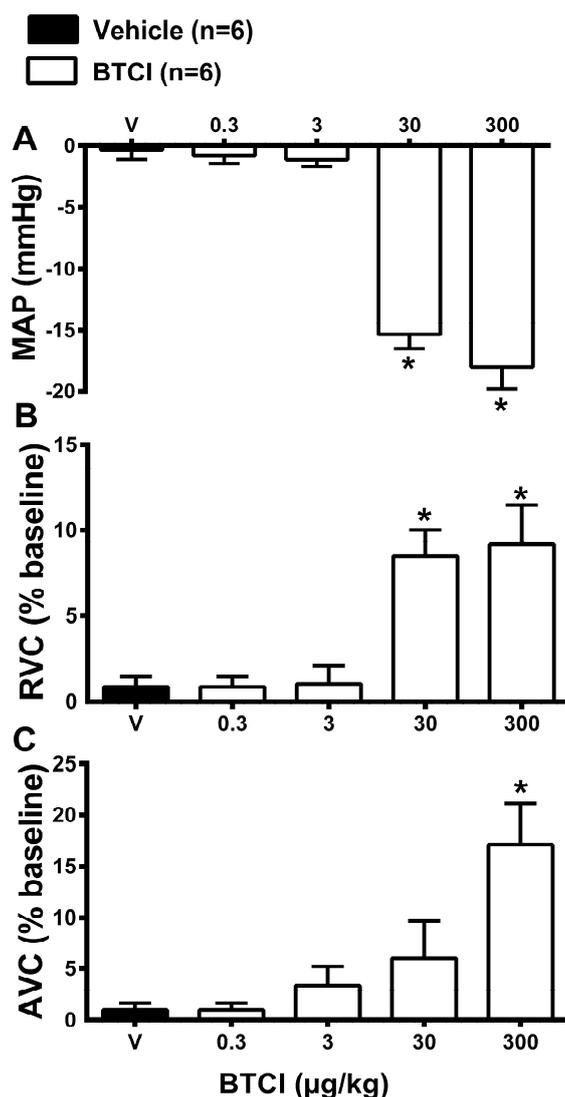
Preliminary experiments were performed to determine the dose of BTCI that does not induce cardiovascular changes. For this purpose, increasing doses of BTCI (0.3, 3, 30 and 300  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.v.) or vehicle (V; NaCl 0.9%) were infused. As expected, infusions of vehicle did not promote changes in mean arterial pressure (MAP;  $-0.3 \pm 0.6$  mmHg from the baseline value; Figure 9A), renal vascular conductance (RVC;  $1 \pm 0.5$  bpm from the baseline value; Figure 9B) and aortic vascular conductance (AVC;  $1.5\% \pm 0.7\%$  from the baseline value; Figure 9C). BTCI infusions at the doses of 0.3 and 3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  did not cause changes in MAP ( $-0.5 \pm 0.7$  and  $-1 \pm 0.5$  mmHg from the vehicle, respectively; Figure 9A), RVC ( $1 \pm 0.2$  and  $1.2\% \pm 1\%$  from the vehicle, respectively; Figure 9B) and AVC ( $1.5 \pm 0.4$  and  $4\% \pm 1.4\%$  from the vehicle, respectively; Figure 9C). However, high doses of BTCI, 30 and 300  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , decreased MAP ( $-15 \pm 1.1$  and  $-18 \pm 1.8$  mmHg from the baseline, respectively; Figure 9A), increased RVC ( $8 \pm 1.6$  and  $9\% \pm 3.4\%$  from the baseline, respectively; Figure 9B) and increased AVC ( $6 \pm 2.1$  and  $17\% \pm 3.5\%$  from the baseline, respectively; Figure 9C). After these results the dose of 3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  was chosen to perform the next series of experiments.

### 2.7. Cardiovascular Effects of the Infusion of Bk and Bk-related Peptides in Association with BTCI or Vehicle

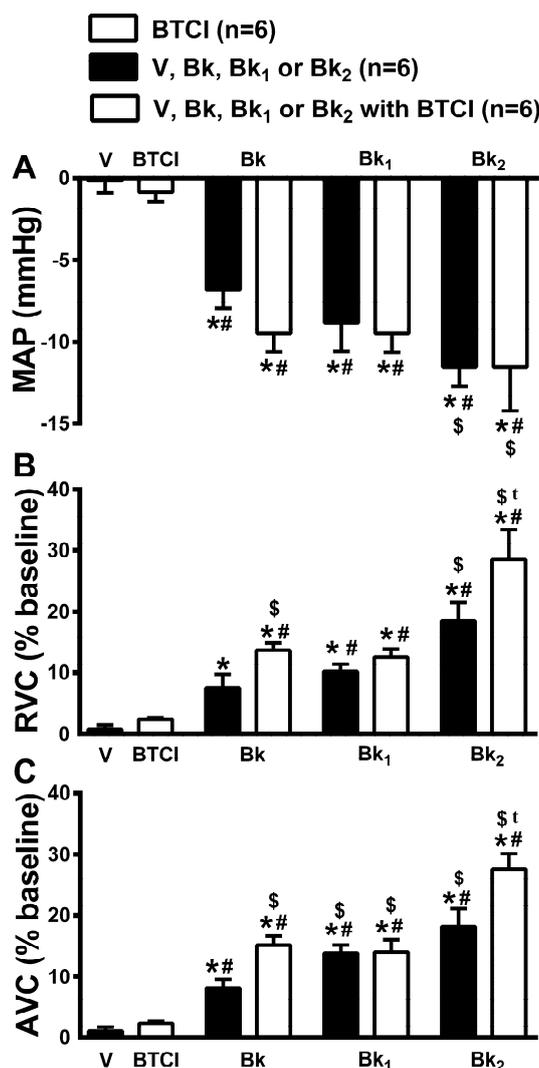
Bk and its related peptides (Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub>) at the dose of 120  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (i.v.) in association with BTCI (3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.v.) or vehicle (NaCl 0.9%) were administrated intravenously to different groups of animals to evaluate the possible hemodynamic effects. MAP ( $-0.3 \pm 0.6$  mmHg from the baseline value; Figure 10A), RVC ( $1 \pm 0.5$  bpm from the baseline value; Figure 10B) and AVC ( $1.5\% \pm 0.7\%$

from the baseline value; Figure 10C). On the contrary, intravenous administration of Bk and Bk-related peptides produced significant hypotension (Bk:  $-7 \pm 1.2$ , Bk<sub>1</sub>:  $-9 \pm 1.8$  and Bk<sub>2</sub>:  $-12 \pm 1.2$  mmHg from the baseline value; Figure 10A), renal (Bk:  $9 \pm 2$ , Bk<sub>1</sub>:  $10 \pm 1.4$  and Bk<sub>2</sub>:  $19\% \pm 3.0\%$  from the baseline value; Figure 10V) and aortic vasodilation (Bk:  $9 \pm 1.6$ , Bk<sub>1</sub>:  $14 \pm 2.2$  and Bk<sub>2</sub>:  $19\% \pm 2.7\%$  from the baseline value; Figure 10C). The association of Bk or Bk<sub>2</sub> with BTCI ( $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.v.) did not change hypotension (Bk:  $-10 \pm 1.1$  and Bk<sub>2</sub>:  $-12 \pm 2.7$  mmHg from the baseline value; Figure 10A), but potentiated renal (Bk:  $12 \pm 1.1$  and Bk<sub>2</sub>:  $29\% \pm 4.9\%$  the baseline value; Figure 10B) and aortic vasodilation (Bk:  $16 \pm 1.4$  and Bk<sub>2</sub>:  $28\% \pm 2.6\%$  from the baseline value; Figure 10C). The association of Bk<sub>1</sub> with BTCI did not alter hypotension ( $-10 \pm 1.1$  mmHg from the baseline value; Figure 10), renal ( $11\% \pm 1.4\%$  from the baseline value; Figure 10) and aortic vasodilation responses ( $14\% \pm 2.0\%$  from the baseline value; Figure 10).

**Figure 9.** BTCI and hemodynamic effects. Cardiovascular responses induced by intravenous administration of BTCI (0.3, 3, 30 and 300  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of b.wt, in 0.1 mL) or Vehicle (V; NaCl 0.9%), in anesthetized rats. (A) Mean arterial pressure (MAP); (B) Renal vascular conductance (RVC); (C) Aortic vascular conductance (AVC). The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \*  $p < 0.05$  compared to V.



**Figure 10.** Bk and Bk related peptides and hemodynamic effects. Cardiovascular responses induced by intravenous administration of BTCI ( $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of b.wt, in 0.1 mL), Vehicle (V; NaCl 0.9%), Bk, Bk<sub>1</sub>, Bk<sub>2</sub> ( $120 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of b.wt, in 0.1 mL, each) or Bk, Bk<sub>1</sub> or Bk<sub>2</sub> associated with BTCI or V in anesthetized rats. (A) Mean arterial pressure (MAP); (B) Renal vascular conductance (RVC); (C) Aortic vascular conductance (AVC). The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \*  $p < 0.05$  compared to Vehicle; # Compared to BTCI, \$ compared to Bk; t compared to Bk<sub>2</sub>.



## 2.8. Discussion

Bk and its analogues are peptides of pharmacological interest that can induce arteriolar dilation, nociceptor hypersensitivity and gastrointestinal smooth muscle contraction. Their degradation by different classes of proteases in plasma and tissues leads to a decrease in their half-life. So far, studies have focused on inhibiting metalloproteases and some serine proteases to increase Bk half-life or its release, respectively, in order to treat heart diseases and hereditary angioedema [9]. The present work describes biophysical characterization of two classes of biologically active molecules, the serine protease inhibitor BTCI and the peptide bradykinin and its analogues, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub>. The hydrodynamic parameters of BTCI and Bk and its analogues, as well as the possible self-association tendency and

complex formation between both molecules, were investigated. DLS measurement shows increased hydrodynamic diameter of BTCI in the presence of peptides indicating the formation of different complexes between BTCI and each Bk. These interactions are probably driven by hydrophobic forces, considering mainly the presence of phenylalanine amino acid residues in the Bk and valine present in the Bk analogues (Table 1) and the unusual hydrophobic surface of BTCI [28,29,32–34]. In addition, the BTCI-Bk complex formation was also indicated by the monodispersivity feature (polydispersity of 0.107) and the hydrodynamic diameter of about 3.3 nm, compatible with the dimensions of both associated molecules. It is intriguing the absence of the Bk and analogues light scattering signal upon complexes with BTCI. It is possible that the predominance of the light scattered signal of the complexes avoid the detection of the peptides.

Fluorescence quenching assays have been used as a tool to sense the solvent accessibility and the microenvironment of tryptophan residues, which are directly associated with conformational changes in proteins or protein-protein complex formation. BTCI presents one single tryptophan residue (Trp<sup>82</sup>) [26], which is largely exposed to the solvent and dominates the fluorescence signal of this protein, which is a rational strategy to monitor protein conformational changes and protein binding processes [41]. In this assay, fluorescence quenching was the primary structural parameter considered as a consequence of BTCI-Bk interactions.

The values of the Stern-Volmer constants ( $K_{sv}$ ), obtained as a function of pH, are two orders of magnitude larger than those for diffusion-limited quenching of free tryptophan in water. It can be attributed to static quenching process [41], caused by BTCI-Bk complex formation before the excitation state. It also shows that hydrophobic interactions between BTCI and Bk can occur near the tryptophan residue as well as within the hydrophobic environment of both molecules. In addition, it may also occur due to changes in ionization of amino acid residues surrounding Trp<sup>82</sup> as a function of different pH condition, favoring the complex formation.

These results are in agreement with those obtained for BTCI-Bk binding assays, in which, comparatively, the higher affinity of Bk to BTCI occurred concomitantly, with conformational changes in the neutral (Bk and Bk<sub>1</sub>) and alkaline (Bk<sub>2</sub>) conditions. The number of binding sites ( $n$ ) of all three Bk was close to one and similar for all evaluated pHs, whereas the binding constants, despite of low affinity, were different. However, comparatively, the affinity of Bk to BTCI was observed to be higher for Bk in pH 7.4 and Bk<sub>2</sub> in pH 9.0 (Table 3). As also indicated by DLS assays, these weak interactions between Bk and BTCI may be driven by hydrophobic forces, considering mainly phenylalanine amino acid residues present in the Bk and valine present in the Bk analogues (Table 1) and the unusual hydrophobic surface of BTCI [28,29,32–34].

Taking all the results into consideration, BTCI seems to be more subject to conformational changes in neutral and alkaline conditions as a result of its residual charges at these different pHs and the binding process occurring by hydrophobic forces. Taken together, these results also reinforce the hypothesis that BTCI can be used as a Bk carrier in the blood system pathway in order to protect Bk against proteolytic attack by proteases and their release in target tissues. Additionally, our findings also indicate that BTCI could remain stable in some tissues to inhibit chymotrypsin or trypsin-like enzymes that cleave and inactivate bradykinin *in situ*. As expected, the kinin-inactivating pathway differs in different tissues and it is probably responsible to differences between results from two bioassays of bradykinin activities using both bradykinin-related peptides Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub>.

In agreement with those results obtained for BTCI-Bk binding assays using DLS and fluorescence quenching, quantitatively the FAR-UV CD spectra of BTCI and BTCI in the presence of the Bk-related peptides indicate that Bk induced a smaller alteration in the secondary structure of BTCI than related peptides. As shown, BTCI forms a complex with all three Bk, but with highest affinity for Bk (Table 3), compatible with minor conformational changes promoting few alterations in its secondary structure content (Table 4).

In order to analyze the relationship between conformational changes in BTCI and its inhibitory activity in the presence of Bk, Bk<sub>1</sub> or Bk<sub>2</sub>, serine proteases enzymatic assays were performed in the presence of Bk-related peptides. In all conditions, the inhibitory activities of BTCI at concentrations in which it showed ~100% of protease inhibition were very similar. Therefore, the Bk-related peptides did not affect the properties of the reactive sites of BTCI, and they probably form complexes with BTCI in a different region of this molecule, driven by hydrophobic forces, as discussed. The maintenance of BTCI inhibitory activity even with the conformational changes caused by the Bk-related peptides could be explained due to the independence between the reactive sites for trypsin and chymotrypsin located in opposite and independent domains of the molecule [28,29].

The action of Bk on smooth muscle was evaluated when they were in complex with BTCI, using guinea pig ileum preparations, a well-characterized smooth-muscle contraction assay, sensitive to Bk. Different concentrations of Bk up to 10  $\mu$ M were able to induce smooth-muscle contraction in a concentration-responsive manner. However, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> were unable to exert their effects on muscle contraction, suggesting that further structural processing for interaction with B<sub>2</sub> receptors or a higher dose than that used in the present assay are necessary. For example, an analogue of bradykinin from frog skin with a similar sequence to Bk<sub>2</sub> (Pro<sup>2</sup>→hydroxyproline) induced smooth muscle contraction with a concentration 10 fold higher (100  $\mu$ M) than Bk. The recovered muscle contraction action was consistent both with primary structure identity shared with mammalian Bk and the slight proline amino acid residue modification [42].

When pretreated with trypsin, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> are cleaved on Arg<sup>9</sup>-Val<sup>10</sup> and Arg<sup>9</sup>-Gln<sup>10</sup>, respectively, and induced smooth muscle contraction, in a concentration-responsive manner. Therefore, exposure of Arg<sup>9</sup> at the C-terminal of both Bk was of fundamental importance for interaction with mammalian B<sub>2</sub> receptors. As is known, Arg<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Gly<sup>4</sup>, Phe<sup>5</sup>, Pro<sup>7</sup>, Phe<sup>8</sup> and Arg<sup>9</sup> are very important for mammalian smooth muscle activation [43]. Interestingly, the presence of Val<sup>1</sup> in both analogues was responsible for an approximately 1.3-fold higher contraction force at 10  $\mu$ M than in Bk, after activation by trypsin treatment (Figure 7). In contrast, Bk analogues pretreated with chymotrypsin were not able to induce smooth muscle contraction (data not shown), highlighting the effect of chymotrypsin, which may decrease Bk action and their half-life time, even without promoting its activation by hydrolysis of the two C-terminal residues. In this case, despite the presence of Val<sup>1</sup>, which enhanced the contraction force on Bk pretreated with trypsin, the cleavage on Phe<sup>5</sup> and Phe<sup>8</sup> led to the complete inactivation of both peptides.

The association between Bk, Bk<sub>1</sub> or Bk<sub>2</sub> with BTCI, in the presence of trypsin or chymotrypsin, was also evaluated. Bk was able to induce smooth muscle contraction in a concentration-responsive manner even in association with BTCI in the presence of serine proteases (Figure 8). BTCI was able to inhibit protease activity and did not alter Bk properties on smooth muscle. On the other hand, Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> did not show any effects in the presence of BTCI and serine proteases. As discussed, the cleavage of both

Bk by trypsin and the prevention of chymotrypsin cleavage are fundamental to enhance smooth muscle contraction of these analogues. In the presence of BTCI, the catalytic activities of both serine proteases are inhibited and may be a strategy to retain the peptides in inactivated form until they are delivered to target plasma and tissues. These results indicated that BTCI may be an appropriate circumstantial carrier of Bk-related peptides as it did not show any alterations in its inhibitory properties, nor did it alters Bk properties on smooth muscle.

The cardiovascular effects of Bk and its related peptides in association with BTCI or vehicle were evaluated *in vivo* experiments. Our results are consistent with the data in the literature, which showed the vasodilation and hypotension responses to Bk [3,4]. Moreover, in the present study, we identify newly synthesized Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub> with effective vascular relaxation and consequent hypotensive effects. Additionally, the association of a protease inhibitor, BTCI potentiated aortic and renal vasodilation induced by Bk and Bk<sub>2</sub> peptides, but these effects were not observed in the Bk<sub>1</sub>. The potentiating of BTCI on Bk<sub>2</sub> but not on Bk<sub>1</sub> hypotensive effect can be explained by the differences of the C-terminal between both Bk-related peptides. Thus, the negatively charged residue at the C-terminus of Bk<sub>1</sub> could release more slowly the active Bk fragment.

Considered together, the results demonstrated that the Bk-related peptides, in special Bk<sub>2</sub>, induced reduction of vascular resistance and consequent hypotension. Therefore this work contributes to our understanding of the therapeutic potential of Bk-related peptides in the treatment of hypertension. Future studies are expected to elucidate the toxicological and the mechanism of action of these new peptides.

### 3. Experimental

#### 3.1. Synthesis and Purification of Bk-related Peptides and Purification of the BTCI

The Bk-related peptides identified in Table 1 were synthesized by standard solid-phase method using the Fmoc strategy. Fmoc-amino acids and reagents for peptide synthesis were purchased from NovaSyn TGA (Novabiochem, San Diego, CA, USA). The synthesis was carried out through steps of deprotection of the Fmoc group using 25% (v/v) 4-methylpiperidine in dimethylformamide (DMF). The peptide bond was formed using O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluoro-phosphate (HBTU) in DMF at room temperature for 90 minutes. The complete desired Bk-related peptide bonded into resin was obtained after successive cycles of removing Fmoc groups and coupling with the subsequent amino acids, as confirmed by Kaiser assay [44]. The peptide was subjected to cleavage from the resin by 95% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), 2.5% (v/v) triisopropylsilane, 2.5% (v/v) in Milli-Q water and precipitated using diisopropylether (−20 °C). The precipitate was collected by filtration, solubilized using 50% (v/v) acetonitrile (ACN) and then lyophilized. Bk-related peptides were purified by HPLC (Class LC-10VP from Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) using a semi-preparative C<sub>18</sub> Vydac 218 TP 510 (Hesperia, CA, USA) reverse phase column with a linear gradient (5%–95%) of ACN. The purity of the samples was analyzed by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) using an UltraFlex III instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) under positive reflector mode with external calibration. Concentration of the synthetic Bk-related peptides was estimated (Equation (1)), as follows [45]:

$$C (\mu\text{g/mL}) = \frac{[(A_{215} - A_{225}) \times 144] + (A_{205} \times 31)}{2} \times \text{dilution factor} \quad (1)$$

BTCI was purified as previously described [46] by ion exchange chromatography using DEAE-cellulose column (Sigma, St. Louis, MO, USA). The purity and molecular mass of BTCI were evaluated by MALDI-TOF/MS. BTCI concentration was determined using its specific absorption coefficient  $A_{280}^{1\%} = 8.23$  and molecular mass of about 9.0 kDa.

### 3.2. Spectroscopic Measurements

#### 3.2.1. Dynamic Light Scattering (DLS) Assays

The hydrodynamic properties of the BTCI through the complex formation with Bk and analogues were monitored using DLS technique with laser source operated at 800 nm on the DynaPro LSR model (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA). The internal temperature was controlled by a Peltier system coupled to the detector. The Bk, Bk-related peptides, BTCI and BTCI-Bk, BTCI-Bk-related peptides complexes, were incubated for 30 minutes in 2 mM Tris-HCl pH 7.4 and then centrifuged at 5000 *g* and filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ) before the DLS experiments. The average of 100 acquisitions for each measure was considered for BTCI (25  $\mu\text{M}$ ) and synthetic Bk-related peptides (25  $\mu\text{M}$ ) separately and subsequently for the BTCI-Bk complexes (1:1). The formation of complexes was analyzed at 37 °C, considering the relationship of the scattered light intensity signal and the hydrodynamic diameter of the samples, using the Dynamics V6 program (Wyatt Technology Corporation).

#### 3.2.2. Circular Dichroism (CD) Assays

Circular dichroism measurements were carried out using the Jasco J-815 spectropolarimeter (Jasco Analytical Instruments, Tokyo, Japan) equipped with a Peltier type temperature controller (Jasco Analytical Instruments). Far-UV spectra were recorded using a 0.1 cm path length quartz cuvette. After four consecutive measurements, signals were accumulated and the average spectrum was corrected for the baseline contribution of the buffer and Bk and Bk-related peptides solutions. Firstly, the CD spectra of BTCI (25  $\mu\text{M}$ ), Bk and Bk-related peptides (25  $\mu\text{M}$ ) were recorded independently in 2 mM Tris-HCl pH 7.4 at 37 °C. Subsequently, the CD spectrum of BTCI (25  $\mu\text{M}$ ) was recorded in the presence of all peptides (25  $\mu\text{M}$ ) in the same conditions. The secondary structure content of BTCI in the absence or presence of Bk and Bk-related peptides was estimated using the CDNN deconvolution software (Version 2.1).

#### 3.2.3. Fluorescence Spectroscopy Assays

Fluorescence measurements were performed at pH 5.0, 7.4 and 9.0 and 25 °C using the Jasco FP-6500 spectrofluorimeter (Jasco Analytical Instruments) coupled to a Jasco ETC-273T Peltier system (Jasco Analytical Instruments) with water circulation. Both excitation and emission slit were fitted to 5.0 nm and the excitation and emission wavelength were 295 nm and 300–400 nm, respectively. The concentration of BTCI was 25  $\mu\text{M}$ , whereas the concentration of Bk and Bk-related

peptides varied from 25 to 500  $\mu\text{M}$ . The BTCI in complex with peptides were investigated by fluorescence quenching as a function of pH. The averages of five fluorescence spectra were recorded and processed by the program Spectra Manager (Jasco Analytical Instruments). The fluorescence emissions were fitted according to the classic Stern-Volmer equation (Equation (2)) [41]:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

where  $F$  and  $F_0$  are the fluorescence intensities in the presence and absence of quencher, respectively,  $K_{sv}$  is Stern-Volmer constant and  $Q$  is the concentration of the quencher.

The binding constants for BTCI, Bk and Bk-related peptides interaction were calculated according to Equation (3):

$$\text{Log}[(F_0 - F)/F] = \text{Log}K_b + n\text{Log}[Q] \quad (3)$$

where  $K_b$  is the binding constant and  $n$  is the number of binding sites per BTCI [47].

### 3.3. Enzymatic Assay

The inhibitory activities of BTCI against bovine pancreatic trypsin (25 kDa;  $A_{280}^{1\%} = 15.90$ ) and chymotrypsin (24 kDa;  $A_{280}^{1\%} = 20.40$ ) (Sigma Co.) were first determined in the absence of Bk and Bk-related peptides [48]. Briefly, the residual enzymatic activities were assayed by mixing 40  $\mu\text{L}$  of chymotrypsin (28.60  $\mu\text{M}$ ) or trypsin (2.57  $\mu\text{M}$ ) with BTCI at concentration range of 0–10  $\mu\text{M}$  for trypsin and 0–40  $\mu\text{M}$  for chymotrypsin at 25  $^\circ\text{C}$  for 15 minutes. After that, 200  $\mu\text{L}$  of 0.40  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  N-glutaryl-L-phenylalanine-*p*-nitroanilide (GPNA) in 50 mM Tris-HCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.6 for chymotrypsin assay or 0.43  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{N}_\alpha$ -benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) in 50 mM Tris-HCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.2 for trypsin assay were added. Substrate hydrolysis was done for 15 minutes and stopped by adding 30% (v/v) acetic acid. The enzymatic assays were also carried out in the presence of Bk at similar concentration of BTCI. The relative enzymatic activities were evaluated by the liberation of *p*-nitroanilide, which was monitored at 410 nm using a SpectraMax Plus 384 Microplate Reader spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The obtained values are an average of three independent measurements. Inhibition curves were obtained by plotting relative activities of the proteases vs. BTCI concentration in the absence or presence of Bk and Bk-related peptides. Statistical analysis was carried out using the Paleontological Statistics (PAST) Software Package for Education and Data Analysis [49]. A value of Student's *t*-test  $p < 0.05$  was considered to denote a significant difference.

### 3.4. Smooth Muscle Constriction Force Assay using Mammalian Bk and Its Analogues Associated with BTCI

Male guinea pigs (*Cavia porcellus*) weighing between 200 and 300 g and fasted for 24 h were euthanized using an overdose of anesthetic at 120 mg/kg (ketamine and xylazine). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institute of Biology, University of Brasilia (Proc. Number 737402/2008). Segments of 2 cm from the terminal portion of the ileum were removed and washed in Tyrode's solution (g/L: 8.00 NaCl, 0.20 KCl, 0.20  $\text{CaCl}_2$ , 0.21  $\text{MgCl}_2$ ), and attached to a glass rod that was immersed in a physiological bath chamber with a

capacity of 10 mL containing Tyrode solution at 37 °C. In the opposite region, a thread of silk was attached to the F-60 isometric transducer connected to a polygraph (NARCO Bio-Systems, Houston, TX, USA). The bath was kept aerated constantly with carbogen (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>). Previously, as a control, smooth muscle response was analyzed using Bk from Sigma Aldrich. Experiments were done in triplicate, and constriction force was analyzed by addition of Bk and analogues in the absence or presence of BTCI, in three concentrations: 1, 5 or 10 µM. The hypotensive effects of the complexes were also evaluated in the presence of trypsin or chymotrypsin. After each experiment, the bath solution was exchanged three times in order to remove the drug used. Statistical analysis was carried out using the Paleontological Statistics (PAST) Software Package for Education and Data Analysis [49]. A value of Student's *t*-test  $p < 0.05$  was considered to denote a significant difference.

### 3.5. Evaluation of the Cardiovascular Effect of Intravenous Infusion of Bk, Bk<sub>1</sub>, Bk<sub>2</sub> and BTCI

All experiments were conducted on adult male Wistar rats (280–350 g). They were obtained from the central animal house of the Federal University of Goiás. Experimental procedures were designed with strict adherence to the National Health Institute Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals as approved by the Ethics Committee, Federal University of Goiás (034/12).

On the day of experiments, the rats were anesthetized with halothane (2%–3% in 100% O<sub>2</sub>; Cristália Ltda, Itapira, SP, Brazil) prior to the catheterization of the right femoral vein and artery. After the catheter placement, the rats were removed from the halothane and the anesthesia was maintained with urethane (1.2 g·kg<sup>-1</sup> b.wt., i.v.; Sigma-Aldrich Co.). The trachea was cannulated to reduce airway resistance. The body temperature was kept at 37 ± 0.5 °C with a thermostatically controlled heated table.

Renal blood flow (RBF) and aortic blood flow (ABF) were measured with an ultrasonic transit-time flowmeter (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, USA). Data were recorded continuously with an analog-to-digital converter (PowerLab 4/25, ML845, AD Instruments, Bella Vista, Australia). Mean arterial pressure (MAP) was determined from the pulsatile signal. Aortic vascular conductance (AVC) and renal vascular conductance (RVC) were calculated by a ratio of ABF and RBF divided by MAP, and were expressed as percentage of baseline. Increasing doses of BTCI (0.3, 3, 30 and 300 µg·kg<sup>-1</sup>, i.v.) were infused. In other group, the cardiovascular effects of Bk and its related peptides (Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub>) at the dose of 120 µg·kg<sup>-1</sup> (i.v.) in association with BTCI (3 µg·kg<sup>-1</sup>, i.v.) or vehicle (NaCl 0.9%) were tested.

Results are presented as means ± S.E.M. The effects of infusion of Bk, Bk-related peptides and BTCI on cardiovascular parameters were analyzed by one-way ANOVA. When groups differed significantly, the Fisher's *post hoc* test was used by GraphPad Prism statistical software version 6.03 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A value of Student's *t*-test  $p < 0.05$  was considered to denote a significant difference.

## 4. Conclusions

In the present study, we showed the actions of Bk and Bk-related peptides on smooth muscle in the presence of BTCI and also under the effect of the serine proteases trypsin and chymotrypsin, as well as *in vivo* effects of the peptides, isolated and associated with BTCI, in renal and aortic vascular reactivity. Our results indicate that formation of BTCI-Bk and BTCI-Bk-related peptides complexes is

probably driven by hydrophobic forces. Moreover, no alteration in the inhibitory activity of BTCI in complex with any of the peptides was observed, and no alteration in smooth-muscle contraction properties of Bk occurred when associated to BTCI. However, when the BTCI-Bk complexes were tested *in vivo*, it was observed a potentiation renal and aortic vasodilation induced by Bk and Bk<sub>2</sub> infusions. These results indicate that the BTCI-Bk-related peptides complexes may be a good strategy to act as a carrier and protective approach for the cleavage of serine proteases, leading to an increase in the half-life of Bk-related peptides. Additionally, our findings also indicate that BTCI could remain stable in some tissues to inhibit chymotrypsin or trypsin-like enzymes that cleave and inactivate bradykinin *in situ*. As expected, the kinin inactivating pathway differs in different tissues and it is probably responsible to differences between results from two bioassays of bradykinin activities using both bradykinin-related peptides Bk<sub>1</sub> and Bk<sub>2</sub>. Furthermore, trials of nanoencapsulation of BTCI-Bk-related peptides could be performed to further evaluate its effects, and the half-life of Bk on a living system could be explored as a strategy to treat cardiovascular diseases.

### Acknowledgments

We thank the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) for access to the dynamic light scattering (DLS) instrument. The authors received financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). The authors thank Marcelo Porto Bemquerer (Laboratory of Mass Spectrometry, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology), for access to and support for the peptide synthesis. We also thank Kelliane Almeida Medeiros and Eduardo Fernandes Barbosa for technical assistance.

### Author Contributions

The draft design of experiments was performed jointly by S.M. Freitas, L.P. Silva, A.C.M. Alvares, E.F. Schwartz and G.R. Pedrino. S.M. Freitas was the supervisor of the work and wrote the paper. A.C.M. Alvares carried out experimental procedures, analyzed the data and collaborated to draft the manuscript. N.O. Amaral and N.R. Trindade performed part of the experimental procedures. All authors helped to draft the manuscript, read and approved the final version submitted.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Dobo, J.; Major, B.; Kekesi, K.A.; Szabo, I.; Megyeri, M.; Hajela, K.; Závodszy, P.; Gál, P. Cleavage of kininogen and subsequent Bradykinin release by the complement component: Mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. *PLoS One* **2011**, *6*, 1–8.
2. Mamenko, M.; Zaika, O.; Doris, P.A.; Pochynyuk, O. Salt-dependent inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> channel—Mediated Sodium reabsorption in the aldosterone-sensitive distal nephron by bradykinin. *Hypertens* **2012**, *60*, 1234–1241.

3. Bhoola, K.D.; Figueroa, C.D.; Worthy, K. Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* **1992**, *44*, 1–80.
4. Regoli, D.; Gobeil, F.; Nguyen, Q.T.; Jukic, D.; Seoane, P.R.; Salvino, J.M.; Sawutz, D.G. Bradykinin receptor types and B2 subtypes. *Life Sci.* **1994**, *55*, 735–749.
5. Regoli, D.; Jukic, D.; Gobeil, F.; Rhaleb, N.E. Receptors for bradykinin and related kinins: A critical analysis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1993**, *71*, 556–567.
6. Carretero, O.A.; Scicli, A.G. Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension* **1991**, *18*, 58–69.
7. McGiff, J.C.; Carroll, M.A.; Escalante, B. Arachidonate metabolites and kinins in blood pressure regulation. *Hypertension* **1991**, *18*, 150–157.
8. Duka, A.; Duka, I.; Gao, G.; Shenouda, S.; Gavras, I.; Gavras, H. Role of bradykinin B1 and B2 receptors in normal blood pressure regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, *291*, 268–274.
9. Golias, C.; Charalabopoulos, A.; Stagikas, D.; Charalabopoulos, K.; Batistatou, A. The kinin system—Bradykinin: Biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system—Bradykinin. *Hippokratia* **2007**, *3*, 124–128.
10. Potthast, R.; Ehler, R.; Scheving, L.A.; Sindic, A.; Schlatter, E.; Kuhn, M. High salt intake increase uroguanylin expression in mouse kidney. *Endocrinology* **2001**, *142*, 3087–3097.
11. Carrithers, S.L.; Taylor, B.; Cai, W.Y.; Johnson, B.R.; Otto, C.E.; Gremberg, R.N.; Jackson, B.A. Guanylyl cyclase-C receptor mRNA distribution along the rat nephron. *Regul. Pep.* **2000**, *95*, 65–74.
12. Erdős, E.G.; Fulong, T.F.; Skidgel, R.A. Angiotensin I-Converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension* **2010**, *55*, 214–220.
13. Kumar, R.; Yong, Q.C.; Thomas, C.M.; Baker, K.M. Intracardiac intracellular angiotensin system in diabetes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2012**, *302*, 510–517.
14. Laskowski, M.; Qasim, M.A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochem. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 324–337.
15. Ryan, C.A. Proteinase inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytol.* **1991**, *28*, 425–449.
16. Franco, O.L.; Santos, R.C.; Batista, J.A.N.; Mendes, A.C.M.; Araújo, M.A.M.; Monnerat, R.G.; Grossi-de-Sá, R.F.; Freitas, S.M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 343–349.
17. Tian, M.; Benedetti, B.; Kamoun, S. A second kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 1785–1793.
18. Kataoka, H.; Itoh, H.; Koono, M. Emerging multifunctional aspects of cellular serine proteinase inhibitors in tumor progression and tissue regeneration. *Pathol. Int.* **2002**, *52*, 89–102.
19. Esse, H.P.; Klooster, J.W.; Bolton, M.D.; Yadeta, K.A.; Baarlen, P.; Boeren, S.; Vervoort, J.; de Wit, P.J.G.M.; Thommas, B.P.H.J. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* **2008**, *20*, 1948–1963.
20. Kennedy, A.R. Chemopreventive agents: Protease inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **1998**, *78*, 167–209.

21. Armstrong, W.B.; Kennedy, A.R.; Wan, X.S.; Taylor, T.H.; Nguyen, T.A.; Jensen, J.; Thompsom, W.; Lagerberg, W.; Meyskens, F.L. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4684–4691.
22. Kennedy, A.R.; Wan, X.S. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Prostate* **2002**, *50*, 125–133.
23. Chen, Y.W.; Huang, S.C.; Lin-Shiau, S.Y.; Lin, J.K. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 1296–1306.
24. Saito, T.; Sato, H.; Virgona, N.; Hagiwara, H.; Kashiwagi, K.; Suzuki, K.; Asano, R.; Yano, T. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin. *Cancer Lett.* **2007**, *43*, 249–257.
25. Joanitti, G.A.; Azevedo, R.B.; Freitas, S.M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer Lett.* **2010**, *293*, 73–81.
26. Morhy, L.; Ventura, M.M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) WaLP seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1987**, *59*, 71–81.
27. Ventura, M.M.; Martin, C.O.; Morhy, L. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.). VI. Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1975**, *47*, 335–346.
28. Freitas, S.M.; Mello, L.V.; Silva, M.C.; Vriend, G.; Neshich, G.; Ventura, M.M. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor- $\alpha$ -chymotrypsin complex. *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 121–128.
29. Barbosa, J.A.R.G.; Silva, L.P.; Teles, R.C.L.; Esteves, G.F.; Azevedo, R.B.; Ventura, M.M.; Freitas, S.M. Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with  $\beta$ -Trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1638–1650.
30. Carvalho, A.F.; Santos-Neto, M.S.; Monteiro, H.S.A.; Freitas, S.M.; Morhy, L.; Nascimento, N.R.F.; Fonteles, M.C. BTCI enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. *Braz. J. Biol.* **2008**, *68*, 157–162.
31. Borgstahl, G.E.O. How to use Dynamic Light Scattering to improve the likelihood of growing macromolecular crystals. In *Macromolecular Crystallography Protocols. Methods in Molecular Biology*; Doublé, S., Ed.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 2007; Volume 363, pp. 109–130.
32. Ventura, M.M.; Mizuta, K.; Ikemoto, H. Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution. A study by light scattering. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1981**, *53*, 195–201.
33. Silva, L.P.; Azevedo, R.B.; Morais, P.C.; Ventura, M.M.; Freitas, S.M. Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. *Prot. Struct. Funct. Bioinform.* **2005**, *61*, 642–648.
34. Ventura, M.M.; Mizuta, K.; Ikemoto, H. Solvent perturbation and surface accessibility of the tryptophyl and tyrosyl groups in black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1984**, *56*, 217–220.

35. Brady, A.H.; Ryan, J.W. Circular Dichroism of Bradykinin and Related Peptides. *Biochem. J.* **1971**, *121*, 179–184.
36. Cann, J.R.; Stewart, J.M.; Matsuedai, G.R. A circular dichroism study of the secondary structure of Bradykinin. *Biochemistry* **1973**, *19*, 3780–3788.
37. Kotovych, G.; Cann, J.R.; Stewart, J.M.; Yamamoto, H. NMR and CD conformational studies of bradykinin and its agonists and antagonists: Application to receptor binding. *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 257–266.
38. Fachetti, H.C.S.; Mizuta, K.; Ventura, M.M. Thermodynamics of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1984**, *56*, 311–317.
39. Freitas, S.M.; Ikemoto, H.; Ventura, M.M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI). *J. Protein Chem.* **1999**, *18*, 307–313.
40. Böhm, G.; Muhr, R.; Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra. *Protein Eng.* **1992**, *5*, 191–195.
41. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 2006; Chapter 8, p. 698.
42. Brand, G.D.; Krause, F.C.; Silva, L.P.; Leite, J.R.S.A.; Melo, J.A.T.; Prates, M.V.; Pesquero, J.B.; Santos, E.L.; Nakaie, C.R.; Costa-Neto, C.M.; *et al.* Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrials*. *Peptides* **2006**, *27*, 2137–2146.
43. Regoli, D.; Barabé, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* **1980**, *32*, 1–46.
44. Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
45. Murphy, J.B.; Kies, M.W. A note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solution. *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *45*, 382–384.
46. Ventura, M.M.; Xavier-Filho, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and partial characterization. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1996**, *38*, 553–566.
47. Hu, Y.J.; Liu, Y.; Hou, A.X.; Zhao, R.M.; Qu, X.S.; Qu, S.S. Studies on the interaction between rare-earth salts of heteropoly  $\text{EuHSiMo}_{10}\text{-W}_2\text{O}_{40}\cdot 25\text{H}_2\text{O}$  and bovine serum albumin. *Acta Chim. Sin.* **2004**, *62*, 1519–1523. (In Chinese)
48. Erlanger, B.F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *95*, 271–278.
49. Hammer, M.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, *4*, 1–9.

*Sample Availability:* Samples of the compounds are available from the authors.