

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Desenvolvimento de inibidores peptídicos para serino proteinases da
coagulação sanguínea humana

Camila Araújo de Lima

São Paulo
2019

Camila Araújo de Lima

**Desenvolvimento de inibidores peptídicos para serino proteinases da
coagulação sanguínea humana**

Monografia de Conclusão do Curso de Especialização
Toxinas de Interesse em Saúde do Instituto Butantan,
sob orientação de Sônia A. de Andrade Chudzinski.

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Lima, Camila Araújo de.

Desenvolvimento de inibidores peptídicos para serino proteinases da coagulação sanguínea humana. / Camila Araújo de Lima ; orientador Sonia Aparecida de Andrade Chudzinski – São Paulo, 2019.

24 p.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Assunto. I. Andrade, Sonia Aparecida de. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP

"Dr. Antônio Guilherme de Souza"

Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Camila Araújo de Lima, aluno(a) do curso Toxinas de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- (X) Imediato
 () 06 meses
 () 12 meses
 () Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 22 de MARÇO de 2019

Camila Lima
.....
aluno(a)

De acordo: *Antônio de Almeida Rodrigues*
Orientador(a):

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por todas as bênçãos e forças concedidas nessa caminhada.

Agradeço imensamente minha orientadora, Sônia Andrade, que durante essa nova etapa me proporcionou momentos especiais, engraçados e de muito aprendizado. Me ensinou como ser uma mulher forte, sem prejudicar o próximo. Serei eternamente grata pela escolha e confiança. Que esse projeto seja o primeiro de muitos!

Agradeço minha companheira de laboratório, Glória, que me ensinou muito sobre síntese, purificação e identificação de peptídeos e graças a ela, morro de amores por um HPLC.

Agradeço ao pessoal do Laboratório Especial de Dor e Sinalização – LEDS por todo o carinho e pela recepção acalorada.

Agradeço aos meus pais, Rubem e Gércia, meus grandes heróis e exemplos de vida, pelo apoio durante esses anos de estudo. Se hoje concluo mais uma etapa é por vocês e para vocês.

Agradeço ao meu namorado, Felipe, pelo apoio e amparo nos momentos de desespero. Sempre presente e disposto a me ajudar, incentivar e mostrar que tudo dará certo no final. Essa conquista também é sua!

Agradeço de coração, minhas princesas Priscila, Michelli e Lizandre, pela amizade, amor e carinho. Sem vocês a vida não teria graça.

Agradeço minha eterna orientadora e mãezona, Marisa Rocha, que me aconselhou muito durante esse último ano. Sempre me mostrou o lado bom da vida e comemorou minhas conquistas. Sempre serei sua baixinha!

Agradeço o Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP (CEFOP).

Agradeço o Instituto Butantan, onde foi possível realizar mais um sonho!

E por fim, agradeço todos que indiretamente me ajudaram a concluir esse projeto.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Princípios da homeostasia	1
Interação de fatores exógenos com as proteinases da coagulação sanguínea ...	2
Inibidores de proteinases	3
Inibidores peptídicos do tipo Kunitz: <i>Bauhinia spp</i>	5
Características das serino proteinases e os mecanismos de inibição.....	6
OBJETIVO GERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
Desenho, Síntese de inibidores peptídicos, purificação e identificação	8
Determinação da atividade inibitória na hidrólise do substrato S-2222 por fator Xa.	9
Características químicas dos peptídeos sintéticos.....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
Desenho, síntese, purificação e identificação dos peptídeos.....	9
Ensaio de inibição enzimática	10
Modificações na sequência peptídica	11
Disseminação e Avaliação dos Resultados.....	13
REFERÊNCIAS.....	14

RESUMO

A coagulação sanguínea, considerada por muito tempo dependente somente de plaquetas e enzimas denominadas fatores de coagulação, atualmente é vista como um sistema altamente regulado, equilibrado e multifacetado, constituído tanto por componentes moleculares quanto celulares e é dividida em três fases que se sobrepõem entre si: iniciação (exposição do plasma em uma lesão endotelial), amplificação (adesão e ativação de mais plaquetas e ativação dos fatores V, VIII e XI) e propagação (formação dos complexos tenases e protrombinase). Após entendimento do mecanismo dos fatores de coagulação, diversos estudos estão sendo desenvolvidos a fim de, produzir fármacos com funções anticoagulantes. Já se é sabido que inibidores de proteinases provenientes de glândulas salivares de animais hematófagos e de origem vegetal, principalmente do gênero *Bauhinia* – objeto de estudo do presente trabalho – têm sido amplamente estudados e constituem uma importante classe de moléculas biologicamente ativas com resultados promissores. Visto que ainda não há um anticoagulante ideal e que os inibidores de proteinases isolados do gênero *Bauhinia*, podem ser usados em estudos de interação enzima-substrato e como potenciais novos fármacos, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de inibidores peptídicos para serino proteinases da coagulação sanguínea humana. Desenho, síntese, purificação e identificação dos peptídeos 1A e 1B foram baseados no sítio reativo do inibidor de fator Xa (BuXI) e do inibidor de tripsina (BvTI), respectivamente. Nos ensaios de inibição enzimática, os peptídeos 1A e 1B foram avaliados quanto à eficácia na inibição do fator Xa humano, apenas o peptídeo 1A inibiu 20% a atividade dessas serino proteinase central da cascata da coagulação sanguínea humana. Modificações na sequência peptídica proporcionaram melhoria na associação desses peptídeos à enzima alvo, afetando de maneira efetiva a atividade catalítica da mesma. E também foi utilizado o programa *protparam* para características químicas dos peptídeos sintéticos.

Palavras-chave: Coagulação. Inibidores de proteinases. Bauhinia

ABSTRACT

Blood clotting, long considered dependent only on platelets and enzymes called coagulation factors, is now seen as a highly regulated, balanced and multifaceted system consisting of both molecular and cellular components and is divided into three overlapping phases : initiation (plasma exposure in an endothelial lesion), amplification (adhesion and activation of more platelets and activation of factors V, VIII and XI) and propagation (formation of tenase complexes and prothrombinase). After understanding the mechanism of coagulation factors, several studies are being developed in order to produce drugs with anticoagulant functions. It is already known that inhibitors of proteinases from salivary glands of hematopoietic and plant origin, mainly of the genus *Bauhinia* – object of study of the present work – have been widely studied and constitute an important class of biologically active molecules with promising results. Since there is still no ideal anticoagulant and the inhibitors of proteinases isolated from the *Bauhinia* genus can be used in enzyme-substrate interaction studies and as potential new drugs, the present work aimed to the development of peptidic inhibitors for serine proteinases human blood coagulation. Design, synthesis, purification and identification of peptides 1A and 1B were based on the reactive factor Xa inhibitor site (BuXI) and trypsin inhibitor (BvTI), respectively. In the enzyme inhibition assays, peptides 1A and 1B were evaluated for efficacy in inhibiting human factor Xa, only peptide 1A inhibited 20% activity of that central serine proteinase from the human blood coagulation cascade. Modifications in the peptide sequence provided an improvement in the association of these peptides with the target enzyme, effectively affecting its catalytic activity. And the program was also used for the chemical characteristics of the synthetic peptides.

Key words: Coagulation. Inhibitors of proteinases. Bauhinia

famílias Fabaceae, Brassicaceae, Poaceae e Solanaceae (DE LEO *et al.*, 2002; NIELSEN *et al.*, 2004; VAN DER HOOM e JONES, 2004; OLIVA *et al.*, 2011).

São classificados como inibidores de serino, cisteíno, aspártico ou metaloproteinase de acordo com o tipo catalítico da proteinase que inibem (BARRET, 1994) e ainda, podem ser agrupados em famílias e clãs de acordo com a similaridade das suas estruturas primárias e terciárias (RAWLINGS, BARRET e BATEMAN, 2010).

Os inibidores de serino proteinases do tipo tripsina são os mais abundantes em plantas particularmente das famílias *Leguminosae* e *Gramineae* (BATEMAN e JAMES, 2011). Eles conferem à planta resistência a parasitos, insetos, larvas, micro-organismos e pragas. Estes IPs inibem as enzimas proteolíticas destes organismos, retardando a proteólise das paredes celulares e de proteínas da membrana da planta, reduzindo a desorganização celular e dificultando a penetração de patógenos e impedindo assim, a mobilização das proteínas de reserva (SILVA-LÓPEZ, 2009).

Vários IPs foram isolados, purificados e caracterizados de diversas espécies de *Bauhinia*. Os primeiros inibidores isolados foram do tipo tripsina e obtidos das espécies *B. petandra* e *B. bauhinoides* (OLIVA, 1986; OLIVA e SAMPAIO, 1988).

Posteriormente foram isolados quatro outros inibidores de tripsina de *B. bauhinoides*: o BbTI-I, o BbTIII que inibe a calicreína pancreática (OLIVA *et al.*, 1999), o BbKI, que inibe exclusivamente a calicreína plasmática humana e o BbCI que é um importante inibidor da atividade da cruzipaina. Esta enzima é a cisteíno proteinase mais importante de *Trypanosoma cruzi*, o causador da Doença de Chagas. Estudos demonstraram que o BbCI induziu morte seletiva deste parasito em cultura, podendo assim constituir uma nova alternativa no tratamento da Doença de Chagas (BILGIN *et al.*, 2010). Em *B. unguata* também foi purificado um IP do tipo tripsina que inibe tanto a calicreína quanto o fator Xa da coagulação (OLIVA *et al.*, 1999).

Os IPs de plantas já estão sendo empregados no tratamento de diversas patologias humanas, visto que inibem proteinases que desempenham funções

1. INTRODUÇÃO

1.1. Princípios da hemostasia

A coagulação sanguínea, considerada por muito tempo dependente somente de plaquetas e enzimas denominadas fatores de coagulação, atualmente é vista como um sistema altamente regulado, equilibrado e multifacetado, constituído tanto por componentes moleculares quanto celulares e é dividida em três fases que se sobrepõem entre si: iniciação, amplificação e propagação.

A fase de iniciação começa com a exposição do plasma a células que expressam o fator tecidual (FT), em razão da lesão endotelial, ativação química do endotélio ou inflamação. Então, o fator VII é ativado ao interagir com o FT, formando o complexo FT/FVIIa. Esse complexo ativa os fatores X e IX. O fator Xa, por sua vez, ativa o fator V. Adicionalmente, o fator Xa e o cofator Va na superfície da célula formam o complexo protrombinase, que converte protrombina em trombina, molécula essencial para a fase de amplificação.

A trombina formada na fase de iniciação contribui para a adesão e ativação de mais plaquetas, além de ativar os fatores V, VIII e XI. Essas plaquetas liberam o fator V parcialmente ativado, que é totalmente ativado pela ação da trombina ou fator Xa. A trombina também catalisa a clivagem do fator de von Willebrand, liberando o cofator VIIIa.

Na última fase, chamada de propagação, observa-se a formação dos complexos tenase e protrombinase, que ocorrem na superfície da membrana das plaquetas ativadas. Inicialmente, o fator IXa desloca-se da célula produtora de FT para as superfícies plaquetárias, contribuindo para a formação do complexo tenase (cofator VIIIa e fator IXa). O complexo tenase então ativa o fator X a fator Xa, que em associação ao cofator V, na presença de ions cálcio, constitui o complexo protrombinase, que catalisa a conversão de protrombina em trombina, que por sua vez, catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo sanguíneo e ainda ativa o fator XIII a fator XIIIa, que estabiliza o coágulo formado.

1.2. Interação de fatores exógenos com as proteinases da coagulação sanguínea

Várias proteínas participantes do sistema hemostático humano interagem especificamente com fatores exógenos que afetam a coagulação sanguínea. A presença de inibidores de proteinases da coagulação nas glândulas salivares de animais hematófagos parece ser uma estratégia desenvolvida durante a evolução, para assegurar o sangue fluído para as necessidades nutricionais dos insetos sugadores.

Hirudina, o mais potente inibidor natural de trombina conhecido (K_i 20 fM) foi purificado da saliva da sanguessuga *Hirudo medicinalis* (MARKWARDT, 1970; LOMBARDI *et al.*, 1999). A hirudina é um polipeptídeo de 65 resíduos de aminoácidos com três ligações de dissulfeto intracadeia e apresenta a Tyr 63' sulfatada (numeração segundo BODE *et al.*, 1992). A região amino-terminal da molécula é globular e muito compacta. Numerosos resíduos de aminoácidos carregados negativamente constituem a região carboxi-terminal do inibidor (RYDEL *et al.*, 1991).

Inibidores do fator Xa, tais como o peptídeo anticoagulante (TAP) e a antistasina (ATS) também provém de animais hematófagos (WAXMAN *et al.*, 1990; NUTT, *et al.*, 1988). A antistasina, isolada das glândulas salivares da sanguessuga mexicana *Haementeria officinalis* (TUSZYNSKI *et al.*, 1987), é um polipeptídeo de 119 resíduos de aminoácidos com um alto teor de cisteína e apresenta elevado grau de similaridade entre as duas estruturas internas. Este fato sugere um possível evento de duplicação gênica, mecanismo este observado previamente em inibidores de serino proteinases do tipo “double head” da família Bowman-Birk (LASKOWSKI e KATO, 1980).

TAP, um peptídeo anticoagulante, isolado do carrapato *Ornithodoros moubata* é tido como um inibidor tipo “tight” e específico para o fator Xa (WAXMAN *et al.*, 1990). Composto por 60 resíduos de aminoácidos, este inibidor possui uma estrutura globular ligada por três ligações de dissulfeto. Estudos por mutagênese indicaram interações entre o inibidor e o exossítio da enzima, mas demonstraram a função da Arg₃ na inibição do fator Xa (MAO *et al.*, 1998).

Inibidores de proteinases de origem vegetal também têm sido amplamente estudados em leguminosas, gramíneas e solanáceas. As sementes de leguminosas apresentam alto teor proteico, sendo, portanto, conveniente fonte de inibidores de proteinases (RICHARDSON *et al.*, 1991).

Classificados em famílias, pelas características de similaridade da sequência primária, de cristalografia e difração de raios-X, de relações topológicas entre as ligações de dissulfeto e de localização do sítio reativo (READ e JAMES, 1988), são cinco as principais famílias: inibidor do tipo Kunitz, inibidor do tipo Bowman-Birk, inibidor do tipo batata I, inibidor do tipo batata II e inibidor do tipo abóbora (RICHARDSON, 1991; WEENZEL e TSCHESCHE, 1995).

Dentre os inibidores do tipo Kunitz está o inibidor isolado das sementes de *Bauhinia unguolata* (BuXI), uma proteína de 20 kDa, que inibe a ação do fator Xa devido alguns resíduos de aminoácidos específicos (Met58, Thr65 e Met66) presentes nas proximidades do local reativo, o que o distingue do inibidor de tripsina BvTI isolado as sementes de *Bauhinia variegata* (OLIVA *et al.*, 2002).

1.3. Inibidores de proteinases

Além dos metabólitos secundários, os inibidores de proteinases (IPs) constituem uma importante classe de moléculas biologicamente ativas em plantas e especialmente no gênero *Bauhinia*. Tais substâncias inibem uma grande variedade de enzimas proteolíticas, que incluem as proteinases da própria planta e as proteinases digestivas de mamíferos, insetos, bactérias e fungos, constituindo um importante mecanismo de defesa contra insetos e patógenos de modo geral (SILVA-LÓPEZ 2009; ZHU-SALZMAN e ZENG, 2015). Os inibidores de proteinases estão amplamente distribuídos em todos os organismos vivos e desempenham papéis fundamentais em quase todos os fenômenos biológicos (VAN DER HOORN, 2008).

A maioria dos IPs são polipeptídeos de 5 a 25 kDa com ligações de dissulfeto, que confere estabilidade a variações de temperatura e pH (GOMES *et al.*, 2011). São encontrados em tecidos de estoque, como sementes, grãos e tubérculos (1-10% da proteína total) e estão distribuídos em sementes das

estratégicas nos organismos humano e animal. Alguns IPs atuam como agentes anti-fibrinolíticos, pois inibem os fatores da hemostasia (VANASSCHE *et al.*, 2015), outros inibem proteinases de células tumorais, demonstrando atrativo potencial anti-câncer (ROOMI *et al.*, 2014; RAKASHANDA *et al.*, 2015).

1.4. Inibidores proteicos do tipo Kunitz: *Bauhinia* spp.

O gênero leguminoso *Bauhinia* espalhado nos trópicos é popularmente chamada de “pata de vaca”. Essa espécie é extremamente utilizada no paisagismo, urbanização e na medicina popular como hipoglicemiante (anti-diabética), purgativa, diurética, antidiarreica, depurativa e tônica renal, sendo uma das 71 plantas selecionadas pelo Ministério da Saúde como de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (VAZ, 2010).

Uma comparação das sequências conhecidas dos membros desta família de proteínas mostrou que a estrutura primária é altamente homóloga. As estruturas revelaram várias características que são conservadas na maioria dos inibidores tipo Kunitz: Mr 20,0 kDa, quatro resíduos de cisteína e a seqüência vizinha ao único sítio reativo, em geral, Arg-Ser ou Arg-Lys, com alto grau de homologia e localização em um circuito fechado por uma ponte dissulfeto (WENZEL & TSCHECHE, 1995; RICHARDSON, 1991).

Dados de sequência primária indicam que dois inibidores isolados de sementes de plantas do gênero *Bauhinia* das espécies *ungulata* e *variegata*, *Bauhinia unguolata* Factor Xa Inhibitor (BuXI) e *Bauhinia variegata* Trypsin Inhibitor (BvTI), respectivamente, são altamente homologos (70%). Ambos inibem tripsina, mas apenas BuXI inibe o fator Xa, enzima central da coagulação humana (OLIVA *et al.*, 2002).

Muitos inibidores de proteinases isolados de planta parecem ligar-se à enzima alvo formando um complexo imediato e estreito (RICHARDSON, 1991). Diversos estudos demonstram que a atividade inibitória e a especificidade dos inibidores em relação à enzima alvo são influenciadas, tanto pelo reconhecimento do substrato por resíduos no local da especificidade primária, quanto em regiões mais distais como o *loop* de superfície (OLIVA, 2002).

Os inibidores de proteinases isolados do gênero *Bauhinia*, podem ser usados em estudos de interação enzima-substrato.

1.5. Características das serino proteinases e os mecanismos de inibição

As serino proteinases são enzimas proteolíticas presente em vírus, bactérias e organismos eucarióticos (RAWLINGS *et al.*, 1993). Formam o conjunto de proteínas da subfamília S1A (família da quimotripsina bovina e tripsina). A estrutura comum mais conhecida dessa família de enzimas é a tríade catalítica constituída pelos resíduos His₅₇, Asp₁₀₂, e Ser₁₉₅ (conforme sistema de numeração baseado no quimotripsinogênio (BODE *et al.*, 1989). Sabe-se que o centro ativo da tríade é composto pela serina 195. A cadeia lateral desse resíduo interage com a histidina 57, por meio de uma ligação de hidrogênio com o anel imidazólico da His₅₇. Já o grupo imidazólico (mais especificamente o grupamento NH) da histidina também forma ligação de hidrogênio, mas desta vez com o grupo carboxila do aspartato 102. A histidina atua no posicionamento da cadeia lateral da serina e na polarização da sua hidroxila. Ao fazer isto, age como catalisador básico geral, como acceptor do íon de hidrogênio, visto que a hidroxila polarizada da serina torna-se apta para desprotonação. A retirada do próton da hidroxila gera um íon alcóxido, que é um nucleófilo muito mais poderoso do que um álcool. O aspartato ajuda a orientar a histidina e por decorrência dos efeitos eletrostáticos torna esse aminoácido em um melhor acceptor de prótons (JEREMY *et al.*, 2002).

Apesar da estrutura conservada entre as serino proteinases, há diferenças de especificidade decorrentes de alterações nos subsítios das enzimas. Esse conceito de especificidade nessas enzimas pode ser dividido em três partes: a “especificidade primária” refere-se à composição básica de resíduos de aminoácidos que será clivado pela enzima. Como exemplo, a tripsina cliva ligações peptídicas nas quais participam o grupo carboxila de aminoácidos básicos, como arginina e lisina; a “especificidade secundária” refere-se à influência dos resíduos de aminoácidos adjacentes à ligação hidrolisada no substrato. A “especificidade secundária” da tripsina pode ser mostrada pela influência negativa exercida por resíduos de prolina, na vizinhança carboxi-terminal da ligação alvo. A “especificidade terciária” pode ser referida como a ação seletiva de proteinases sobre outras proteínas. Como exemplo de

“especificidade terciária”, pode-se citar a cascata da coagulação sanguínea na qual os zimogênios, precursores enzimaticamente inativos, são ativados por proteólise limitada (NEIL *et al.*, 1966).

Há três mecanismos de controle da ação enzimática das serino proteinases: o controle da proteólise das proenzimas (zimogênios), já que as enzimas são primariamente sintetizadas como proteínas inativas precursoras (NEURATH e WALSH, 1976); a regulação da expressão gênica, que pode ocorrer por controle epigenético; a inibição dessas enzimas, que pode ser alcançada pela formação de complexos inativos com o uso de inibidores proteicos (LASKOWSKI e KATO, 1980).

O sítio reativo de um inibidor de proteinase é entendido como a parte da molécula que entra diretamente em contato com o sítio ativo da enzima, para formar o complexo inibidor-enzima (TSCHESCHE, 1974). Nesses pseudo substratos, o resíduo na posição P₁, alvo para a hidrólise enzimática, é o principal elemento no estabelecimento da interação do inibidor com a enzima, uma vez que é o resíduo que, diretamente, interage com o sítio ativo da enzima. Os resíduos de aminoácidos adjacentes a P₁ contribuem para a especificidade do inibidor, pois as características próprias da cada aminoácido estabelecem outras interações, como ligações de hidrogênio, ligações salinas ou impedimento estérico, que são fundamentais na determinação da função inibitória da proteína (SCHECHTER e BERGER, 1967; BRIDE *et al.*, 1996; KALLIES e MITZNER, 1996).

Visto que ainda não há um anticoagulante ideal e que os inibidores de proteinases isolados do gênero *Bauhinia*, podem ser usados em estudos de interação enzima-substrato e como potenciais novos fármacos, o presente trabalho objetiva Desenvolvimento de inibidores peptídicos para serino proteinases da coagulação sanguínea humana.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente projeto foi desenhar, sintetizar, purificar e identificar inibidores peptídicos para serino proteinases da coagulação sanguínea humana.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenho de peptídeos;
- Síntese, purificação e identificação por métodos analíticos;
- Análise teórica de características físico química dos peptídeos;
- Atividade inibitória.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho, Síntese de inibidores peptídicos, purificação e identificação.

Os peptídeos foram desenhados com base em substratos reconhecidos e hidrolisados por trombina símile presentes no veneno de *Bothrops jararaca*. Os inibidores peptídicos foram sintetizados em fase sólida (SPFS), utilizando a estratégia Fmoc para proteção dos grupos N- α -amino, baseada na estratégia de proteção ortogonal, desenvolvida por Barany e Merrifield (Wong; Zimmerman, 2013). As etapas de desproteção dos N- α aminoácidos, bem como as reações de acoplamento ocorreram em sintetizador automático Shimadzu PSSM-8. A clivagem e a desproteção final de cada peptídeo foi realizada com um coquetel de clivagem apropriado a composição da estrutura primária de cada peptídeo (Tabela 1). Os inibidores peptídicos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando fase estacionária em fase reversa (C18 (15 cm x 5 μ m)) e então identificados por espectrometria de massa. A eluição do material bruto foi realizada usando as seguintes fases móveis: solvente A (solução 0,1% de ácido fórmico em água); solvente B (0,1% de ácido fórmico, 90% de acetonitrila em água). A taxa do fluxo decorrente da análise da cromatografia foi 0,6mL/min, e um gradiente linear foi aplicado: 0 min, 5% B; 25 min, 90% B; 27 min, 100% B; 30 min, 100% B; 45 min, 5% B. Os inibidores peptídicos foram sintetizados e purificados no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto Butantan com apoio técnico da Química Regiane Spirandelli da Silva e sob a supervisão da Dra. Sonia A. de Andrade Chudzinski.

3.2. Determinação da atividade inibitória na hidrólise do substrato S-2222 por fator Xa.

A inibição do fator Xa (20 nM) foi determinada pela medida da atividade enzimática residual sobre seu respectivo substrato derivados de p-nitroanilina. As reações de hidrólise foram realizadas a 37°C, em tampão Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, contendo 150 mM de NaCl e, ao fim de 10 minutos, foram adicionados 10 µL do substrato S-2222 (2mM), em volume final de 200 µL, prosseguindo-se a incubação a 37°C, por mais 20 minutos. A hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada pela leitura fotométrica A405 nm da p-nitroanilina produzida.

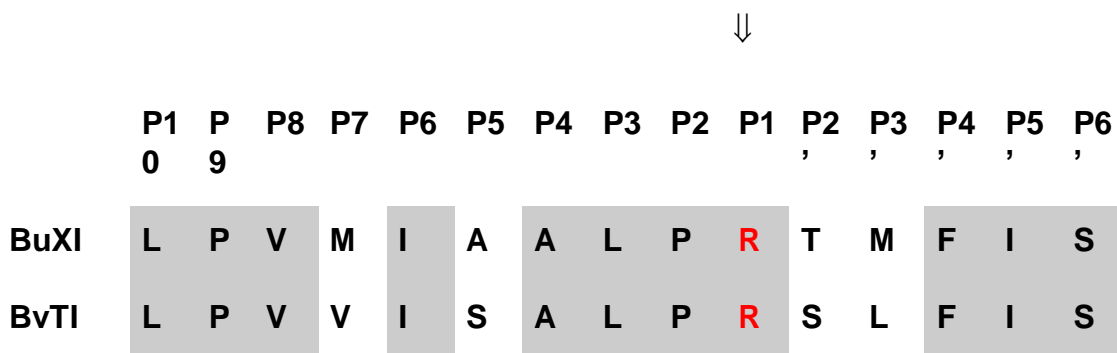
3.3. Características químicas dos peptídeos sintéticos

As características dos peptídeos sintetizados foram deduzidas, utilizando o programa “protparam” disponível em <http://www.expasy.org/tools>

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenho, síntese, purificação e identificação dos peptídeos.

Inicialmente os peptídeos 1A e 1B foram desenhados com base no sítio reativo (Figura 1) do inibidor de fator Xa (BuXI) e do inibidor de tripsina (BvTI) respectivamente.



Os aminoácidos em P₁ estão indicados pela seta e os resíduos idênticos estão destacados em cor cinza.

Figura 1 - Sequência primária da região dos sítios reativos dos inibidores BuXI e BvTI comparadas com o inibidor de tripsina isolado do feijão-de-soja (SBTI).

Feito isso, os peptídeos foram sintetizados (Tabela 1), purificados e identificados, conforme descrito em material e métodos.

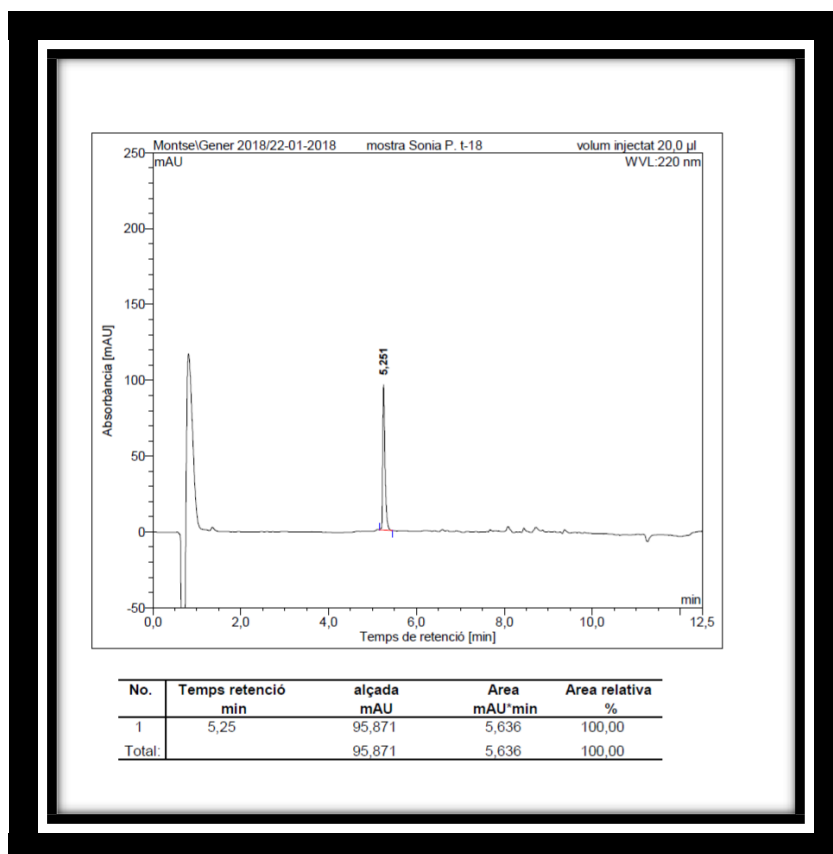


Figura 2. Perfil cromatográfico do peptídeo 1A puro.

4.2. Ensaios de inibição enzimática

Em seguida, de acordo com o método descrito, os peptídeos 1A e 1B foram ensaiados quanto à eficácia na inibição do fator Xa humano. Conforme demonstrado na Tabela 1, apenas o peptídeo 1A inibiu 20% a atividade dessa serino proteinase central da cascata da coagulação sanguínea humana. Esses resultados demonstram que a interação enzima-peptídeo foi similar àquela observada na interação enzima-inibidor, visto que apenas o peptídeo baseado na sequência primária do inibidor do fator Xa foi capaz de afetar a atividade catalítica dessa enzima.

Tabela 1: Determinação da atividade inibitória dos peptídeos

Peptídeo	Sequência	Fator Xa humano
1A	VMIAALPRTMFIQ	-20%
1A _D	VMIAALPR _D TMFIQ	-50%
1B	VVIAALPRTVFIQ	NI
1C	VMIAALPRQ	NI
1D	TMFIQ	NI

Legenda: (-) decréscimo de atividade; NI: não inibe.

4.3. Modificações na sequência peptídica

A utilização de D-aminoácidos e a síntese da sequência em ordem invertida confere maior resistência à proteólise em relação à sequência composta apenas por L-peptídeos. Visando a melhoria da constante de associação e o decréscimo de velocidade de dissociação à enzima alvo, a L-arginina foi substituída pela forma D (1A_D) e o peptídeo denominado 1D foi sintetizado conforme descrito em métodos. Da mesma forma, esse peptídeo na concentração (1mg/mL) foi avaliado como possível inibidor do fator Xa humano. Conforme demonstrado na Tabela 1, como esperado, as mudanças estruturais proporcionaram melhoria na associação desses peptídeos à enzima alvo, afetando de maneira efetiva a atividade catalítica da mesma.

4.4. Características químicas dos peptídeos sintéticos

As características dos peptídeos sintetizados foram deduzidas, utilizando o programa “protparam” disponível em <http://www.expasy.org/tools> e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Características dos peptídeos sintetizados foram deduzidas, utilizando o programa “protparam” disponível em <http://www.expasy.org/tools>.

Sequência	MM	<H>	<μH>	z	RE	RP	RA	R+	R-	RAR	pl
VMIAA LPRT MFIQ	1361,78	0,857	0,153	1	CYS 0 PRO 1	3 / 23.08	10 / 76.92	ARG 1	GLN 1 THR 1 GLY 0	PH E 1	7.72
VVIAA LPRTV FIQ	1297,65	0,855	0,152	1	CYS 0 PRO 1	3 / 23.08	10 / 76.92	ARG 1	GLN 1 THR 1 GLY 0	PH E 1	9.72
VMIAA LPRQ	869,14	0,673	0,350	1	CYS 0 PRO 1	2 / 22.22	7 / 77.78	ARG 1	GLN 1 GLY 0	-----	9.72
TMFIQ	509,67	-----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5.19

***MM:** massa molar; **<H>** Hidrofobicidade; **<μH>** momento hidrofóbico; **z** carga líquida; **RE** resíduos especiais; **RP** resíduos polares + GLY (n /%); **RA** resíduos apolares (n/%) ; **R+** resíduos carregados; **R-** resíduos não carregados + GLY; e **RAR** resíduos aromáticos.

Como demonstrado na Tabela 2, os peptídeos 1A e 1B apresentam características físico-químicas muito similares e em ambos o resíduo alvo para a hidrólise enzimática (P1), o principal elemento no estabelecimento da interação do inibidor com a enzima, ou seja o resíduo que interage com o sítio ativo da enzima é arginina (ARG). Porém apenas o peptídeo 1A inibe o fator Xa. Esses resultados reforçam a importância dos resíduos de aminoácidos adjacentes a P₁ na contribuição para a especificidade do inibidor, já que as características próprias da cada aminoácido estabelecem outras interações, como ligações de hidrogênio, ligações salinas ou impedimento estérico, que são fundamentais na determinação da função inibitória de uma molécula.

5. Disseminação e Avaliação dos Resultados

Parte do presente trabalho terá continuidade durante o mestrado da aluna Camila Araújo de Lima. Dentre as perspectivas estão:

- Determinar a constante de inibição e o mecanismo de inibição do peptídeo 1A em relação a inibição do fator Xa;
- Analisar a ação do peptídeo 1A nos testes globais de coagulação sanguínea humana;
- Analisar *in vivo* a ação anticoagulante do peptídeo 1A.

6. REFERÊNCIAS

BARRET AJ. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, v.244, p. 1-15. 1994.

BATEMAN KS, JAMES MN. Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Current of Protein Peptide Science*,v.12, p.340-347. 2011.

BILGIN M, NEUHOF C, DOERR O, BENSCHIED U, ANDRADE SS, MOST A, ABDALLAH Y, PARAHULEVA M, GUENDUEZ D, OLIVA ML, ERDOGAN A. 2010. *Bauhinia bauhinioides* cruzipain inhibitor reduces endothelial proliferation and induces an increase of the intracellular Ca²⁺ concentration. *Journal of Physiological Biochemistry*, v.66, p. 283-290.

BODE W, HUBER R. Eur. J. Biochem. 1992.

BUENO NR, FRITZ H, AUERSWALD EA, MENTELE R, SAMPAIO M, SAMPAIO CA, OLIVA ML. Biochem Biophys. Res. Commun. 1999.

DE LEO, F.; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L.R. 2002. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, v. 30, p. 347-348.

GOMES MTR, OLIVA ML, LOPES MTP, SALAS CE. Plant proteinases and inhibitors: An overview of biological function and pharmacological activity. *Current Protein Peptide Science*, v. 12, p. 417-436. 2011.

HEDSTROM L. Serine Protease Mechanism and Specificity. Chem. Rev. v. 102, p. 4501-4523. 2002.

JEREMY JY, YIM AP, WAN S, ANGILINI GD. Oxidative stress, nitric oxide and vascular disease. *Cardiovasc Surg*, 2002. 17:324-327.

LASKOWSKI JM, KATO I. Protein Inhibitor of Proteinases. Ann. Ver. Biochem. 49: 593-626., 1980.

MARKWARDT F. Fibrinolytics and Antifibrinolytics, ed. Springer Science & Business Media, 1970.

NIELSEN PK, BONSAGER BC, FUKUDA K, SVENSSON B. 2004. Barley alpha-amylase/ subtilisin inhibitor: structure, biophysics and protein engineering. *Biochemistry et Biophysics Acta*, v.1696, p. 157-164.

NUTT EM, GASIC T, RODKEY J. 1988. The amino acid sequence of antistasin. J Biol Chem 263:10,162-10,167.

NUTT EM, JAIN D, LENNY AB, SCHAFFER L, SIEGL PKS. 1991. Purification and characterization of recombinant antistasin a leech-derived inhibitor of coagulation factor Xa. *Arch Biochem Biophys* 285:37- 44.

OLIVA ML, SOUZA-PINTO JC, BATISTA IF, ARAUJO MS, SILVEIRA VF, AUERSWALD EA, MENTELE R, ECKERSKORN C, SAMPAIO UM, SAMPAIO CA. *Biochim. Biophys. Acta*.

OLIVA MLV, SALLAI RC, SAMPAIO CAM, FRITZ H, AUERSWALD EA, TANAKA UM. *Immunopharmacology*, 1996.

OLIVA MLV. *Isolamento e caracterização preliminar de inibidores de proteinase de sementes de Enterobium contotiliquum, Torresea cearenses, Bauhinia petandra e Bauhinia bahinoides*. Tese (Doutorado). Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo. 1986.

OLIVA MLV, ANDRADE S, BATISTA IFC, SAMPAIO UM, JULIANO M, FRITZ H, AUERSWALD EA, SAMPAIO CAM. Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xa inhibitor isolated from *Bauhinia unguolata* seeds. *Immunopharmacology*, v. 45, p. 145–149. 1999.

OLIVA MLV, FERREIRA RS, FERREIRA JG, DE PAULA CA, SALAS CE, SAMPAIO UM. Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: a mini review. *Current Protein Peptide Science*, v. 12, p. 348-57. 2001.

OLIVA MLV, MENDES CR, JULIANO MA, CHAGAS JR, ROSA JC, GREENE LJ, SAMPAIO UM, SAMPAIO CAM. Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinoides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. *Immunopharmacology*, v. 45, p. 163–169. 1999.

OLIVA MLV, SAMPAIO UM, SAMPAIO CAM. Isolation and characterization of plant inhibitors directed against plasma kallikrein and factor XII. *Advances in Medical Biology*, v. 247, p. 467-471. 1988.

RAKASHANDA S, QAZI AK, MAJEED R, ANDRABI SM, HAMID A, SHARMA PR, AMIN S. Plant-derived protease inhibitors LC-pi (*Lavatera cashmeriana*) inhibit human lung cancer cell proliferation in vitro. *Nutrition in Cancer*, v. 67, p. 156-166. 2015.

RAWLING ND, BARRETT AJ, BATEMAN A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. 227-233. 2010.

RAWLINGS ND, BARRETT AJ, BATEMAN A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. 343-350. 2012.

RICHARDSON M. *Methods in Plant Biochemistry*. 1991.

ROOMI, M.W.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. 2014. Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines. *International Journal of Oncology*, v. 45, p. 887-894.

RYDEL J, TULINSKY A. Refined Structure of the Hirudin-Thrombin Complex Timothy. 1991.

SAMPAIO CA, OLIVA ML, SAMPAIO UM, BATISTA IF, BUENO NR, TANAKA AS, AUERSWALD EA, FRITZ H. Immunopharmacology. 1996

SCHERAGA HA, LASKOWSKI M. The fibrinogen-fibrin conversion. *Advances in protein chemistry*, v. 12, p. 1-131, 1957.

SILVA-LÓPEZ, R.E. 2009. Proteases Inhibitors Originated from Plants: Useful Approach for Development of New Drug. *Revista Fitos*, v.4, p.108-119.

TSCHESCHE H. Biochemistry of natural proteinase inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 13, n. 1, p. 10-28, 1974.

TUSZYNSKI GP, GASIC TB, GASIC GJ. Isolation and characterization of antistasin. An inhibitor of metastasis and coagulation. 1987.

VAN DER HOORN, R.A.; JONES, J.D. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defense. *Current Opinion in Plant Biology*, v.7, p. 400-407.

VANASSCHE, T.; VANDENBRIELE, C.; PEERLINCK, K.; VERHAMME P. 2015. Pharmacotherapy with oral Xa inhibitors for venous thromboembolism. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*, v.16, p. 645-58.

VAZ AMSF. 2010. *Bauhinia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB082666>).

WAXMAN L, JORDAN SP, SMITH DE, VLASUK GP. Tick Anticoagulant Peptide: Kinetic Analysis of the Recombinant Inhibitor with Blood Coagulation Factor Xa. 1991.

WAXMAN L, SMITH DE. ARCURI KE. VLASUK GP. *Science*, 1990.

ZHAO, Q.L.; WU, Z.B.; ZHENG, Z.H.; LU, X.H.; LIANG, H.; CHENG, W.; ZHANG, Q.Y.; ZHAO, Y.Y. 2011. Phenolic acid derivatives from *Bauhinia glauca* subsp. *Pernervosa*, v. 46, p. 946-950. ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R.

2015. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual Reviews of Entomology*, v.60, p. 233-252.