

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Giani Del Ciello

Caracterização da atividade cininogénica no líquido pericárdico humano

Uberaba

2015

Giani Del Ciello

Caracterização da atividade cininogénica no líquido pericárdico humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Roseli Aparecida da Silva Gomes

Uberaba

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

M375c Del Cielo, Giani
Caracterização da atividade cininogénica no líquido pericárdico humano
/ Giani Del Cielo. -- 2015.
45 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015
Orientadora: Profa. Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Puzer

1. Pericárdio. 2. Líquido pericárdico. 3. Caliceínas. 4. Cininas. I. Gomes,
Roseli Aparecida da Silva. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III.
Título.

CDU 611.11

Giani Del Ciello

Caracterização da atividade cininogénica no líquido pericárdico humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: 15 de setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Roseli Aparecida da Silva Gomes – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Prof. Dr. Geraldo Thedei Junior
Universidade de Uberaba (UNIUBE)

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva.
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

AGRADECIMENTOS

À professora Roseli Aparecida Silva Gomes, pela orientação, apoio, disponibilidade e principalmente pela paciência e confiança durante a realização desse trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica, Geraldo Garcia Freitas Júnior e Marco Tulio Parolini pelo auxílio imprescindível na realização desse trabalho.

Ao professor Luciano Puzer, pela co-orientação, participação e colaboração na realização desse trabalho.

Aos professores Doutores Luiz Juliano Neto e Adriana Karaoglanovic Carmona, do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina (EPM/UNIFESP), pela gentileza de ter fornecido os substratos necessários para os experimentos.

À minha família pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao meu namorado Rafael Régis Resende, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras de incentivo e pela transmissão de confiança e de força em todos os momentos.

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro das seguintes instituições:

FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) – APQ-02581-10

FUNEPU (Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba)

UFTM (Universidade Federal do Triângulo Mineiro)

UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo)

RESUMO

O líquido pericárdico está em contato com o coração e reflete seu *status* fisiológico. Durante os processos patológicos cardíacos, o nível de fatores bioquímicos no fluido pericárdico é significativamente alterado, sendo considerado um ótimo material para pesquisas cardiovasculares. Atividade de enzimas das classes de serino, aspartil e cisteíno peptidases já foram descritas no fluido pericárdico. Como estas classes enzimáticas têm sido incluídas como cininogenases, e a bradicinina exerce um importante papel de proteção do sistema cardiovascular pela sua potente ação vasodilatadora, a caracterização de atividade cininogénica no fluido pericárdico é de grande interesse no entendimento dos processos de regulação do tônus vascular neste local. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade de enzimas presentes no líquido pericárdio gerar cininas. Vinte e três (23) amostras de fluido pericárdico humano, obtidas durante procedimentos cirúrgicos de revascularização coronária, cirurgia de aorta torácica e substituição valvar, foram analisadas quanto às atividades de aspartil, serino e cisteíno proteases. Para determinação das atividades enzimáticas foram utilizados os substratos sintéticos, com apagamento intramolecular de fluorescência, Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp (suscetível à hidrólise por aspartil peptidases), Abz-AIKFFRLQ-Eddnp (suscetível à hidrólise por aspartil e cisteíno peptidases), Abz-MISLMKRPQ-Eddnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp (sequências N e C terminais em torno da bradicinina), na faixa de pH de 2,0 a 9,0. Inibidores (Pepstatina A, PMSF e E-64) foram utilizados para caracterizar as classes enzimáticas. As hidrólises foram avaliadas através da variação de fluorescência. Os pontos de clivagem nos substratos com sequências do cininogênio foram monitorados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e da análise de aminoácidos dos fragmentos liberados. Todas as amostras de fluido pericárdico utilizadas neste estudo hidrolisaram os substratos testados. O pH ótimo de hidrólise dos peptídeos pelas enzimas do fluido pericárdico para cada um dos substratos foi 4,0 (Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, Abz-AIKFFRLQ-Eddnp, Abz-MISLMKRPQ-Eddnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp), inibida pela Pepstatina A; 6,0 (Abz-AIKFFRLQ-Eddnp) inibida por E-64; e 8,0 (Abz-MISLMKRPQ-Eddnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp) inibida por PMSF. Os resultados mostram que o fluido pericárdico humano hidrolisou os substratos relacionados ao cininogênio. Para o substrato Abz-MISLMKRPQ-Eddnp os dados obtidos foram $75 \pm 31 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ (média \pm DP) em pH ácido, e $334 \pm 161 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ (média \pm DP) em pH 8,0. Os inibidores enzimáticos foram úteis para mostrar que aspartil e serino proteases são as classes enzimáticas com potencial atividade cininogénica

no fluido pericárdico. A análise cromatográfica dos peptídeos e de aminoácidos dos fragmentos liberados após as hidrólises permitiu observar que cada um dos substratos foi clivado em uma única ligação. Em pH 4,0 os produtos fluorescentes foram similares aos fragmentos obtidos da hidrólise por uma protease ácida renal que libera MLBK do cininogênio humano, com clivagem das ligações Leu-Met e Arg-Ser nos substratos Abz-MISLMKRPQ-Eddnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp, respectivamente. Em pH 8,0 os produtos de hidrólise apresentaram tempos de retenção comparáveis aos obtidos para a caliceína plasmática e a hidrólise ocorreu nas ligações Lys-Arg e Arg-Ser para os mesmos substratos, sugerindo a liberação de bradicinina. Nas condições de ensaio utilizadas não foi possível identificar atividade cininogênica relacionada a cisteíno peptidases. Nossos resultados mostram que o fluido pericárdico humano contém enzimas com potencial atividade cininogênica, corroborando com outros estudos que sugerem que o conteúdo de peptídeos do fluido pericárdico não deve ser consequência apenas do fluxo do fluido intersticial miocárdico. Ainda não podemos afirmar se este fluido contém substratos para a atividade cininogênica e se as cininas liberadas localmente tem significância fisiológica.

Palavras-chave: Líquido pericárdico. Cininogenase. Cininas.

ABSTRACT

The pericardial fluid is in contact with the heart and reflects its physiological status. During cardiac disease processes, the level of biochemical factors in the pericardial fluid is significantly changed, being considered a great material for cardiovascular research. Enzyme activity class of serine, aspartyl and cysteine peptidases have been described in the pericardial fluid. As these enzyme classes have been included as kininogenases, and the bradykinin plays an important role in the cardiovascular system protection, for its potent vasodilator action, the characterization of kininogenase activity in the pericardial fluid is of great interest in understanding the regulatory processes of vascular tone at this location. The aim of this study was to investigate the ability of enzymes present in the pericardial fluid generate kinins. Twenty-three (23) human pericardial fluid samples obtained during surgical procedures for coronary revascularization, thoracic aortic surgery and valve replacement were analyzed for aspartyl, serine and cysteine proteases activities. To determine the enzymatic activity were used Fluorescence Resonance Energy Transfer substrates, Abz-KPIEFFRL-EDDnp (susceptible to hydrolysis by aspartyl peptidases), Abz-AIKFFRLQ-EDDnp (susceptible to hydrolysis by aspartyl and cysteine peptidases), Abz-MISLMKRPQ-EDDnp and Abz-FRSSRQ-EDDnp (N- and C-terminal sequences around the bradykinin) in the pH range 2.0 to 9.0. Inhibitors (Pepstatin A, and E-64 PMSF) were used to characterize the enzymatic classes. The hydrolysis were assessed by fluorescence variation. The cleavage sites in substrates with kininogen sequences were monitored by high-performance liquid chromatography (HPLC) and amino acid analysis of the released fragments. All the pericardial fluid samples used in this study hydrolyzed substrates tested. The optimum pH for hydrolysis of peptides by enzymes in the pericardial fluid to each of the substrates was 4.0 (Abz-KPIEFFRL-EDDnp, Abz-AIKFFRLQ-EDDnp, Abz-MISLMKRPQ-EDDnp and Abz-FRSSRQ-EDDnp) inhibited by Pepstatin A; 6.0 (Abz-AIKFFRLQ-EDDnp) inhibited by E-64; and 8.0 (Abz-MISLMKRPQ-EDDnp and Abz-FRSSRQ-EDDnp) inhibited by PMSF. The results show that the human pericardial fluid hydrolyzed substrates related kininogen. For Abz-MISLMKRPQ-EDDnp the data obtained were $75 \pm 31 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ (mean \pm SD) at acid pH, and $334 \pm 161 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ (mean \pm SD) at pH 8.0. Enzyme inhibitors are useful for showing that aspartyl and serine proteases are enzyme classes with potential kininogenase activity in the pericardial fluid. Chromatographic analysis of peptides and amino acids of fragments released after the hydrolysis allowed observing that each of the substrates was cleaved into a single connection.

At pH 4.0 fluorescent products were similar to fragments obtained from hydrolysis by renal acid protease that releases MLBK the human kininogen with cleavage of Leu-Met and Arg-Ser bonds in substrates Abz-MISLMKRPQ-EDDnp and Abz-FRSSRQ-EDDnp, respectively. At pH 8.0 the hydrolysis products had retention times comparable to those obtained for the plasma kallikrein and hydrolysis has occurred in the Lys-Arg and Arg-Ser bonds for the same substrates, suggesting the release of bradykinin. At these assay conditions it was not possible to identify kininogenase activity related to cysteine peptidases. Our results show that the human pericardial fluid contains enzymes with the potential kininogenase activity, which corroborates with studies suggesting that the peptide content of pericardial fluid must not only be a consequence of myocardial interstitial fluid. If pericardial fluid contains substrates to kininogenase activity, and kinins released in this locally has physiological significance, remains to be determined.

Keywords: Pericardial fluid. Kininogenase. Kinins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização anatômica do pericárdio, epicárdio miocárdio e endocárdio.....	15
Figura 2 - Monitoramento da clivagem do substrato Abz-MISLMKRPQ-EDDnp em pH 4,0 e pH 8,0.....	31
Figura 3 - Análise de aminoácidos dos fragmentos do substrato Abz-FRSSRQ-Eddnp em pH 8,0.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Perfil de detecção das atividades enzimáticas presente no fluido pericárdico.....	29
Tabela 2 - Atividade enzimática do fluido pericárdico humano sobre Abz-MISLMKRPQ-Eddnp.....	30
Tabela 3 - Pontos de hidrólise nos substratos sintéticos	33

LISTA DE SIGLAS

°C- Graus Celsius

μM- micromolar

μL- microlitros

λ_{em} – comprimento de onda de emissão

λ_{ex} - comprimento de onda de excitação

Abz – Ácido *o*-benzóico

ANP - Peptídeo natriurético atrial

Arg - Arginina

B1R – Receptor de bradicinina 1

B2R – Receptor de bradicinina 2

BK – Bradicinina

BNP - Peptídeo natriurético cerebral

Ca²⁺ - Cálcio

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP – Desvio Padrão

Eddnp – Etilenodiaminodinitrofenol

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EPM/UNIFESP - Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo

eNOS – Óxido Nítrico sintase endotelial

FGF2 - Fator de crescimento básico do fibroblasto

GMPC – Guanosina de monofosfato cíclico

h - Horas

HC-UFTM – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

HMWK – Cininogênio de Alto Peso Molecular

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

HVE – Hipertrofia ventricular esquerda

IL-6 – Interleucina 6

IL-1 β – Interleucina 1 β

iNOS – Óxido Nítrico sintase induzível

K⁺ - Potássio

KKS – Sistema calicreína-cinina

KLKs – Calicreína relacionada a peptidases/ Calicreína tecidual

Leu - Leucina

LMWK – Cininogênio de Baixo Peso Molecular

Lys - Lisina

M- molar

Met- Metionina

Mim - Minutos

mL – microlitro

MLBK - metionil-lisil-bradicinina

mM - milimolar

nm- nanamômetro

NO – Óxido nítrico

PG - Prostaglandinas

PGI₂ – Prostaciclina

pH - Potencial hidrogeniônico

PK – Calicreína plasmática

PMC - células mesoteliais do pericárdio

PMSF- Fenilmetilsulfonil fluoreto

ROS – Espécies reativas de oxigênio

Ser – Serina

TFA - Ácido trifluoracético

TRIS - Tris-hidroximetilaminometano

UV/VIS – Ultravioleta/ visível

VSMC – Músculo liso vascular

SUMÁRIO

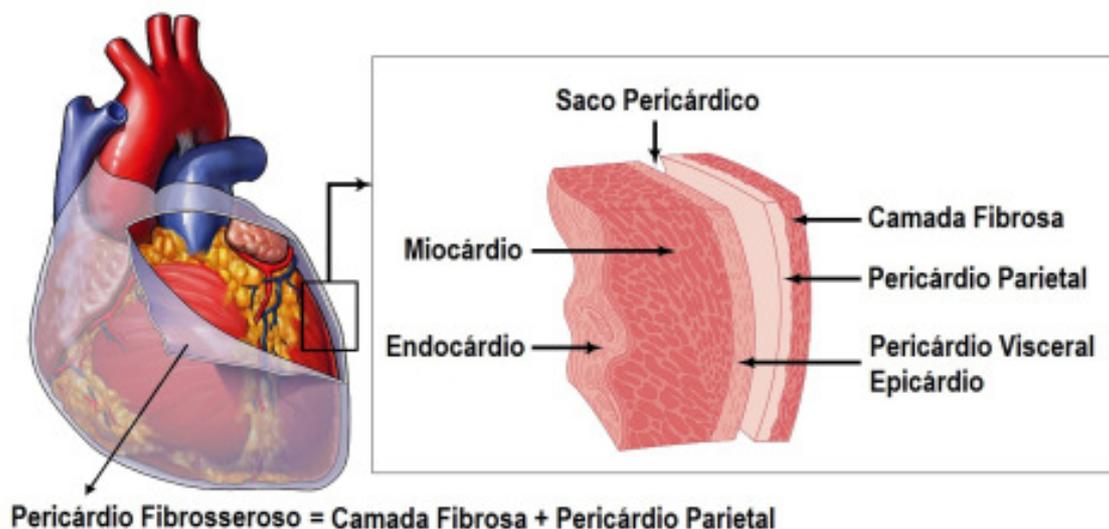
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 PERICÁRDIO.....	15
1.2 LÍQUIDO PERICÁRDICO.....	17
1.3 CININOGENASES.....	19
1.4 CININAS.....	21
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVO GERAL	25
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 OBTENÇÃO DO FLUIDO PERICÁRDICO.....	26
4.2 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS SOBRE SUBSTRATOS SINTÉTICOS COM SUPRESSÃO INTRAMOLECULAR DE FLUORESCÊNCIA.....	26
4.3 MONITORAMENTO DA CLIVAGEM DOS SUBSTRATOS COM SUPRESSÃO INTRAMOLECULAR DE FLUORESCÊNCIA.....	27
5 RESULTADOS	29
5.1 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS SOBRE SUBSTRATOS SINTÉTICOS COM SUPRESSÃO INTRAMOLECULAR DE FLUORESCÊNCIA.....	29
5.2 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DO FLUIDO PERICÁRDICO HUMANO SOBRE O SUBSTRATO Abz-MISLMKRPQ- Eddnp.....	30
5.3 MONITORAMENTO DA CLIVAGEM DOS SUBSTRATOS COM SUPRESSÃO INTRAMOLECULAR DE FLUORESCÊNCIA.....	30
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A	44
ANEXO B	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 PERICÁRDIO

O pericárdio é uma bolsa fibro-serosa que envolve o coração (Gardner et al., 1988). Ele é formado por duas camadas: a camada externa que é constituída de tecido fibroso, relacionada com as estruturas do mediastino medio, como o diafragma; e a camada interna que é constituída por uma fina membrana serosa que se reflete para superfície do coração. Essa camada serosa apresenta uma lâmina externa (parietal), aderida firmemente ao pericárdio fibroso e uma lâmina interna (visceral), aderida ao coração. O espaço virtual formado entre essas duas lâminas é denominado cavidade pericárdica ou saco pericárdico e contém de 15 a 35 mL de líquido seroso (Figura 1).

Figura 1 - Localização anatômica do pericárdio, epicárdio miocárdio e endocárdio



Fonte: melhorsaude.org

Quando analisamos detalhadamente a morfologia do pericárdio parietal humano (Ishihara et al., 1980), observamos uma organização em três camadas: serosa, fibrosa e uma camada mais externa de tecido conjuntivo epipericárdico. A camada epipericardial contém principalmente grandes feixes grossos de colágeno que fazem parte do ligamento

pericardiosternal e a fibrosa contém camadas, orientadas variadamente, de fibras de colágeno e pequenas fibras elásticas. A camada serosa, por sua vez, consiste de uma camada superficial de células mesoteliais, apoiada sobre uma lâmina basal. A densidade populacional de células mesoteliais varia de área para área, ao longo do pericárdio parietal, como também seu aspecto, de extremamente pavimentoso a células mais espessas e menos achatadas, com núcleos mais proeminentes. A superfície das células mesoteliais é cobertas com microvilosidades, distribuídos ao longo da superfície ou concentrados centralmente ou periféricamente na superfície celular. Há complexos juncionais entre as células mesoteliais adjacentes, os desmosomos, que reforçam a adesão e a *zonulae occludentes* intercelulares, formando barreiras de permeabilidade (Ishihara et al., 1980, 1981). Estudos do transporte de substâncias pelo pericárdio evidenciaram que moléculas relativamente pequenas podem ser removidas da cavidade pericárdica, provavelmente por meio dos capilares subepicárdicos, e que grandes moléculas e discretas partículas (ouro coloidal, carbono coloidal) são removidas muito lentamente (Drinker; Field, 1931; Holt, 1970; Ji; Nie, 2008; Maurer; Warren; Drinker, 1940). As junções intercelulares constituem barreiras limitando a passagem de macromoléculas que poderiam atravessar a camada mesotelial por uma rota intercelular. Esta barreira, constituída pelas células mesoteliais, contribui para manter a composição característica do líquido pericárdico, com conteúdo protéico total de aproximadamente 1/3 a 1/4 do plasma sanguíneo (Gibson; Segal, 1978; Maurer; Warren; Drinker, 1940). No pericárdio parietal são encontrados, também, os estômatos linfáticos, pequenas aberturas de capilares linfáticos na superfície do mesotélio, que, em condições fisiológicas, servem como os principais canais de drenagem para a absorção, mantendo a homeostase das cavidades serosas. Os estômatos linfáticos do pericárdio ligam-se com os vasos submesoteliais linfáticos do pericárdio, formando uma rota direta com o sistema de vasos para o líquido pericárdico (Wang; Li; Li, 2010).

A principal função do pericárdio parietal é a restrição do volume cardíaco durante a diástole, particularmente das câmaras direitas, além da estabilização do coração no mediastino e da proteção mecânica contra disseminação de infecções de órgãos contíguos. O pericárdio visceral é responsável pela produção de líquido pericárdico, importante para diminuição da fricção que ocorre entre as lâminas pericárdicas, secundárias à movimentação cardíaca na sístole e diástole (Imazio, 2011).

Mais recentemente, o pericárdio foi descrito como um modulador de pressão intracardiaca, limitando a distensão aguda de qualquer uma das câmaras cardíacas e preservando a função miofibrilar (Czum et al., 2014).

Além de seu papel mecânico, o pericárdio pode contribuir para a regulação da função cardiovascular por meio de um mecanismo parácrino. As células mesoteliais do pericárdio (PMC) são uma fonte potencial dos mediadores cardioativos, como prostaglandinas e fator natriurético atrial, encontradas no espaço pericárdio in vivo. Segundo Mebazza et al. (1998), esses mediadores poderiam difundir a partir do líquido pericárdico para o miocárdio e vasos sanguíneos e alterar diretamente a função contrátil dos miócitos cardíacos.

1.2 LÍQUIDO PERICÁRDICO

O líquido pericárdico é um fluido seroso biológico complexo e dinâmico que está em contato com o coração e reflete seu *status* fisiológico (Xiang et al., 2013).

O fluido pericárdico é considerado um ultrafiltrado de plasma e contém uma concentração global de proteínas um terço a um quarto menor que este (Gibson; Segal, 1977). Porém, Xiang et al. (2013) mostrou, na análise proteômica do líquido pericárdico, que 34,8% das proteínas encontradas no líquido pericárdico não estavam presentes no plasma, sugerindo que ambos possuem composições diferentes. Além disso, têm sido descritas algumas proteínas que possuem uma maior concentração no fluido pericárdico em comparação com o soro. Estas substâncias não são ativamente concentradas a partir do soro, mas são provavelmente liberadas do miocárdio e do pericárdio, pelas células mesoteliais, para o espaço intersticial e se difundem posteriormente para a cavidade pericárdica (Fernández et al., 2008). Tanaka et al. (1998), mostrou que o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP) estão presentes no líquido pericárdico em maior concentração do que no plasma, sugerindo que eles são secretados predominantemente dentro do espaço pericárdico. Outro estudo demonstrou que o fator de crescimento básico do fibroblasto (FGF2), importante no crescimento normal dos miócitos, está normalmente presente no líquido pericárdico humano, independentemente da doença cardíaca subjacente. A concentração FGF2 foi 20 vezes maior no líquido pericárdico do que no soro, sendo provavelmente liberado para o espaço pericárdico do interstício (Corda et al., 1997).

Estudos recentes sugerem que o líquido pericárdico é a janela bioquímica do coração e um ótimo material para pesquisas cardiovasculares. Durante os processos patológicos cardíacos, o nível de fatores bioquímicos no fluido pericárdico é significativamente alterado, incluindo hormônios, peptídeos natriuréticos, neurotransmissores, citocinas, fatores de crescimento e de apoptose (Xiang et al., 2013). Os níveis de BNP em líquido pericárdico foram considerados os mais sensíveis e precisos indicadores de disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, mostrando que o aumento dos níveis de BNP em líquido pericárdico pode ter um papel fisiopatológico importante na insuficiência cardíaca como um fator antifibrótico, atenuando a fibrose do miocárdio (Watanabe et al., 2009). Em outro estudo, com adrenomedulina, um peptídeo vasodilatador, mostrou que sua maior concentração no líquido pericárdico em comparação ao plasma pode refletir sua ação como um mediador local contra a remodelação cardíaca em pacientes com disfunção ventricular esquerda (Tambara et al., 2002).

O líquido pericárdico também pode ter importante função diagnóstica, por exemplo, nas doenças malignas e infecções pericárdicas crônicas. A elevação de citocinas no líquido pericárdico introduz uma era de diagnóstico e estadiamento de algumas doenças (Coats, 2001), sendo que vários tipos de citocinas foram detectadas no líquido pericárdico de pacientes com diferentes formas de doença cardíaca (Riemann et al., 1994). Shikama et al. (2000) relatou uma alta concentração de IL-6 no líquido pericárdico em paciente com pericardite reumatóide. Outro estudo mostrou que concentrações elevadas de IL-1 β no fluido pericárdico podem refletir a extensão da aterosclerose coronariana e também pode promover diretamente o processo aterosclerótico (Oyama et al., 2001)

Além das citocinas, a presença de enzimas no líquido pericárdico tem sido relatada. Várias enzimas têm suas atividades detectadas no líquido pericárdico. Por exemplo, a detecção da atividade da catepsina D na linfa cardíaca, no líquido pericárdico e no plasma de cães com isquemia miocárdica induzida mostrou um aumento nos dois primeiros fluidos quando comparado ao grupo controle, enquanto que no plasma não houve qualquer aumento detectável. Este achado parece indicar uma maior liberação de enzimas lisossomais provenientes do miocárdio para o espaço intersticial durante a isquemia do miocárdio (Araki; Takenaka, 1975). Também foi identificada uma enzima conversora de angiotensina-I no fluido pericárdico humano, sendo observada maior atividade da enzima neste fluido que no plasma de pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular (Gomes et al., 2008). Em um estudo mais recente foi evidenciada a degradação de bradicinina no líquido pericárdico, mostrando ainda

diferenças relacionadas à idade e gênero no metabolismo de bradicinina (BK) em pacientes com doença arterial coronariana, sendo menores em mulheres idosas (Bechtloff et al., 2011).

Estudos realizados por Limana et al. (2010) identificaram que a injeção de líquido pericárdico humano de pacientes com isquemia miocárdica aguda na cavidade pericárdica de corações de rato não infartados, provocou a proliferação de células do epicárdio e a expressão do gene envolvido no desenvolvimento embrionário, o WT1, o que também ocorreu com células de pericárdio humanas em cultura. Os fatores envolvidos com a proliferação de células c-kit+, células tronco que após infarto agudo do miocárdio em camundongos migram e se diferenciam em células miocárdicas e vasculares, estavam aumentados nos fluidos de pacientes com isquemia miocárdica aguda quando comparados com fluidos de pacientes não isquêmicos.

Nesta visão, o líquido pericárdico não representa simplesmente um lubrificador entre as folhas do pericárdio e do epicárdio, mas sim um importante reservatório de mediadores que podem modular as funções das células cardíacas. Um desequilíbrio de fatores do fluido pericárdico pode afetar a reparação fisiológica do coração e, portanto, um melhor conhecimento da composição deste fluido pode ajudar a identificar "fatores cardiogênicos" que regulam positivamente as células do epicárdio e miocárdio (Limana; Capogrossi; Germani, 2011).

1.3 CININOGENASES

As cininogenases são uma grande família de enzimas que produzem peptídeos hipotensores, as cininas, por clivagem proteolítica do cininogênio (Oza et al., 1990).

As calicreínas são cininogenases do grupo das serino-proteases com específicas ações proteolíticas, divididas em duas grandes categorias: calicreína plasmática (PK) e calicreína relacionada à peptidases (KLKs), também chamada de calicreína tecidual. Essas duas categorias diferem-se significativamente em sua localização no plasma ou nos tecidos, respectivamente. O peso molecular, a especificidade de substrato, a estrutura do gene e a produção de cininas também são diferentes (Pathak et al., 2013).

A calicreína plasmática participa do sistema calicreína-cinina (KKS) clivando o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) para gerar a bradicinina. A calicreína tecidual cliva o cininogênio de baixo peso molecular (LMWK) para gerar Lys-bradicinina (calidina) que é subsequentemente convertida em BK por uma segunda clivagem por aminopeptidase (Kaplan et al., 1998).

No sistema cardiovascular, o sistema calicreína-cinina (KKS) exerce um fino controle de tônus muscular liso e pressão arterial, desempenhando um efeito cardioprotetor significativo. Distúrbios neste sistema estão associados à hipertensão arterial, isquemia do miocárdio e outras complicações clínicas (Marcondes; Antunes, 2005)

As catepsinas são proteases lisossomais responsáveis pela degradação e turnover de proteínas em pH ácido e também pertencem à família das cininogenases. As catepsinas A e G são serino proteases, D e E aspartil proteases e existem 11 catepsinas cisteíno proteases: B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W (Turk et al., 2012). Elas são sintetizadas como preproenzimas. A procatepsina é formada após a remoção do prepeptídeo durante a passagem pelo retículo endoplasmático. Subsequentemente, as catepsinas ativas podem ser produzidas após a remoção proteolítica do propeptídeo nos compartimentos ácidos dos lisossomos ou endossomos. Nesses compartimentos, então, elas realizam a degradação de proteínas intracelulares e endocitadas (Qin; Shi, 2011).

As catepsinas cisteíno proteases são membros da família da papaína que compreendem principalmente endopeptidases, com exceção da catepsina B, exopeptidase, e da catepsina H, aminopeptidase (Cheng et al., 2012). A maioria das catepsinas, tais como B, F, H, K, L, e V, são otimamente ativas em ambientes ácidos e tornam-se inativas em pH neutro. A catepsina S, no entanto, permanece parcialmente ativa em pH neutro (Qin; Shi, 2011).

Durante processos inflamatórios, uma grande quantidade de cisteíno proteases lisossômicas são lançadas no líquido extracelular. Consequentemente, a hidrólise de cininogênio por esta classe de enzimas poderia representar uma via alternativa para produção de cininas. A atividade cininogenásica das cisteíno proteases a partir de algumas bactérias patogênicas foi descrita e relacionada à sua capacidade de invasão e patogenicidade (Puzer et al., 2005). Para catepsinas humanas, experiências *in vitro* têm demonstrado que a catepsina L e catepsina B podem gerar de cininas a partir cininogênios (Puzer et al., 2005).

A catepsina D é uma aspartil protease caracterizada pela ótima atividade em pH ácido. A presença de cininogenases ácidas foi descrita no tecido vascular, com atividade de catepsina

D na aorta e no ventrículo esquerdo de cães (Moshi et al., 1992). Foi caracterizada também atividade cininogênica de uma proteinase aspártica renal (Gomes et al., 1997). A pepsina, outra importante aspartil protease, também foi relacionada com a liberação de cinina, Met-Lys-Bradykinin-Ser, pela clivagem do cininogênio (Gomes et al., 1996).

1.4 CININAS

As cininas são geradas a partir da clivagem do cininogênio pelas cininogenases. Existem dois tipos de cininogênio, o plasmático, conhecido como cininogênio de alto peso molecular (HMWK), cuja clivagem gera bradicinina, e o tecidual, conhecido como cininogênio de baixo peso molecular (LMWK) que gera a calidina quando clivado (Pathak et al., 2013).

As cininas são peptídeos de baixo peso molecular que participam de processos inflamatórios, devido a sua capacidade de ativar as células endoteliais e, como consequência, provocar vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, produção de óxido nítrico e mobilização do ácido araquidônico. Cininas também estimulam terminações nervosas sensoriais. Assim, os parâmetros clássicos de inflamação (rubor, calor, edema e dor) podem todos resultar da formação de cininas (Kaplan et al., 2002). Dessa forma, nas lesões locais, grandes quantidades de cininas são produzidas e, como agentes pró-inflamatórios, estimulam a migração de células (leucócitos e monócitos) do sangue para os tecidos, promovendo a síntese de prostaglandinas e citocinas, que aumentam o fluxo sanguíneo produzindo rubor (Bockmann; Paegelow, 2000; Santos et al., 2003). Além disso, as cininas ativam seus receptores sensoriais produzindo dor e promovem a dilatação dos vasos capilares e constrição das veias favorecendo, assim, a formação de edemas e causando deficiências funcionais em alguns órgãos (Regoli et al., 2012).

A bradicinina e a calidina são os mais potentes e eficientes agentes vasodilatadores deste grupo, que são particularmente ativos em artérias periféricas e coronárias (Cruden; Newby, 2005). A vasodilatação pelas cininas é provocada por vários mecanismos: liberação de óxido nítrico (NO), de prostaciclina (PGI₂) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), inibição da produção de ânion superóxido, inibição da liberação de catecolaminas dos terminais nervosos simpático das artérias e inibição da liberação de endotelina (Regoli et al., 2012).

Os efeitos fisiológicos da calidina e bradicinina são exercidos através de receptores da bradicinina, B1R e B2R. O receptor B2 é constitutivamente expresso, enquanto o B1 se torna expresso em estados inflamatórios (Schmaier; McCrae, 2007).

O mecanismo vasodilatador mais eficiente é sustentado pela cascata de óxido nítrico ("cascata NO"), que é iniciada pelas cininas através da ativação dos receptores B1 e B2 do endotélio. Isto ocorre porque o B2R induz um aumento de Ca^{2+} intracelular, que ativa a NO sintase endotelial (eNOS) e, assim, promove a formação de óxido nítrico (Heitsch, 2003; Linz et al., 1999; Madeddu et al., 2007; Vanhoutte, 2009). A liberação de NO pelo B1R envolve ativação de NO sintase induzível (iNOS) independente de cálcio (Kuhr et al., 2010). O óxido nítrico difunde-se nas células do músculo liso vascular (VSMC), onde induz a formação de guanosina de monofosfato cíclico (GMPc), o relaxante potente do VSMC (Regoli, 2004; Vanhoutte, 2009).

Além do papel fundamental do NO, há a contribuição de outros dois fatores endógenos, a PGI₂, sintetizada a partir do ácido araquidônico, que é um potente vasodilatador e o EDHF que provoca a abertura dos canais de K^+ e reduz a tonicidade de VSMC (Gryglewski, 2008).

As cininas também exercem um papel defensivo e de proteção, que é dirigido para melhorar as funções do sistema cardiovascular, em particular, o coração e o endotélio. Uma moderada e contínua produção de cininas parece ocorrer no endotélio para modular o tônus das arteríolas e manter um adequado fluxo de sangue para os tecidos. A este nível, as cininas promovem a formação e a liberação de NO, reduzem a produção de reativos espécies de oxigênio (ROS) e, assim, protegem as funções do coração e os vasos arteriais periféricos. Sugere-se que a redução da calicreína tecidual cardíaca e do cininogênio cardíaco podem ser responsáveis pela geração reduzida de bradicinina no coração. Ao inibir a proliferação e crescimento do músculo liso vascular e dos cardiomiócitos, as cininas contribuem para a redução de hipertrofia cardíaca e do espessamento da parede arterial que ocorre na hipertensão (Chao; Chao, 2005; Rhaleb et al., 2011). Assim, os componentes deficientes do KKS no coração podem ser a causa da disfunção miocárdica na manutenção da pressão arterial elevada e da hipertrofia ventricular esquerda (HVE) cardíaca. (Sharma, 2008).

Estudos realizados em ratos, cães e seres humanos revelaram que cininas também são liberadas sob condições de isquemia e infarto do miocárdio, suportando a hipótese de que o KKS pode ser considerado o principal mediador na proteção do coração nessas condições

(Sharma, 2008). E, notavelmente, cininas inibem a síntese de colágeno, o passo inicial de fibrose (Chao et al., 2007).

Além disso, a inativação da bradicinina na parede vascular pelas cininases pode ter papel na regulação da pressão arterial e do fluxo sanguíneo local (Hial et al., 1979), sendo que medicamentos inibidores de cininase II causam aumento local de bradicinina, o que contribui para diminuição da pressão arterial.

2 JUSTIFICATIVA

Substâncias vasoativas são descritas no fluido pericárdico de humanos e, devido a sua posição estratégica para receber informações sobre as doenças que afetam o coração, é de grande interesse seu estudo bioquímico, visando compreender a funcionalidade de proteases na fisiologia deste ambiente.

A presença de sistemas cininogenases-cininas tem sido relacionada à ação local no controle do tônus vascular, e a sua detecção no fluido pericárdico pode indicar algum papel na regulação do fluxo sanguíneo no miocárdio adjacente, bem outras atividades biológicas atribuídas às cininas, visto que os peptídeos aí liberados podem ter livre trânsito entre a cavidade pericárdica e o músculo cardíaco.

Assim, este trabalho se justifica devido à importância de se identificar as classes enzimáticas presentes no fluido pericárdico e a sua propriedade cininogenásica utilizando material humano coletado *in vivo*.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar a capacidade de enzimas presentes no líquido pericárdio em gerar cininas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a atividade proteolítica no fluido pericárdico, usando substratos com apagamento intramolecular de fluorescência, com sequências suscetíveis à hidrólise por serino proteases, cisteíno proteases e aspartil proteases e inibidores;
2. Verificar as classes enzimáticas capazes de hidrolisar peptídeos com sequências N e C terminais em torno da bradicinina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO FLUIDO PERICÁRDICO

As amostras do fluido pericárdico foram coletadas de 23 pacientes portadores de doenças cardiovasculares e que se submeteram a cirurgias cardíacas por indicações clínicas diversas (ANEXO A). A coleta do material foi feita pelo médico responsável pela realização do procedimento cirúrgico no setor de Cirurgia Cardíaca do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM). O fluido pericárdico, coletado em seringas estéreis, imediatamente após a incisão realizada no saco pericárdico, foi acondicionado a 4°C para o transporte até o laboratório. A quantidade média de líquido pericárdico obtida dos pacientes foi de 3,4 mL. As amostras que não apresentavam sinais visíveis de contaminação com sangue foram centrifugadas a 3000G, por 10 minutos, a 4°C, imediatamente congeladas e estocadas a -80°C para posterior utilização. Somente foram coletadas amostras cujo termo de consentimento livre e esclarecido tenha sido assinado pelo paciente (CEP: 1353 - 26/03/2009). Importante ressaltar que nas cirurgias realizadas, o saco pericárdico uma vez aberto, não volta a ser fechado, devido ao risco de tamponamento cardíaco. Assim, o líquido pericárdico seria descartado imediatamente após a abertura do saco pericárdico.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS SOBRE SUBSTRATOS SINTÉTICOS COM SUPRESSÃO INTRAMOLECULAR DE FLUORESCÊNCIA

Para determinação das atividades enzimáticas foram utilizados os substratos sintéticos Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, Abz-MISLMKRPQ-Eddnp, Abz-AIKFFRLQ-Eddnp, Abz-FRSSRQ-Eddnp sintetizados e gentilmente fornecidos pelos Professores Doutores Luis Juliano Neto, Maria Aparecida Juliano, do departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP). Esses substratos sintéticos são compostos de um grupo fluorescente, Abz (Ácido *o*-benzóico), e um grupo supressor de

fluorescência, Eddnp (Etileno-diamino-dinitrofenol). Com a hidrólise de qualquer ligação da cadeia peptídica entre o grupo doador e o grupo supressor há o desaparecimento da supressão, gerando um aumento na emissão da fluorescência, a qual é proporcional à atividade enzimática (CHAGAS et al., 1991). As leituras da fluorescência emitida foram feitas em espectrofluorímetro HITACHI F-2000, empregando comprimento de onda de excitação de 320 nm (λ_{ex} 320 nm) e de emissão de 420 nm (λ_{em} 420 nm).

O substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp é susceptível à hidrólise por aspartil proteases e o Abz-AIKFFRLQ-Eddnp é susceptível à hidrólise por aspartil e cisteíno proteases. Os substratos Abz-MISLMKRPQ-EDDnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp contêm a sequência N-terminal e C-terminal em torno da bradicinina, respectivamente.

Os tampões utilizados, Tris-hidroximetilaminometano p.a. (TRIS), fosfato de sódio p.a. e acetato de sódio p.a., (Merck) foram adquiridos comercialmente, assim como os inibidores E-64, Pepstatina A, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) (Sigma).

Inicialmente, os quatro substratos Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, Abz-MISLMKRPQ-Eddnp, Abz-AIKFFRLQ-Eddnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp foram incubados com o líquido pericárdico (50 μ L) em pH de 2,0 a 9,0 para determinação do pH ótimo de hidrólise para cada um deles. As atividades foram expressas semi-quantitativamente como indicativo da ocorrência de hidrólise.

Cada substrato (concentração final de 5 μ M) foi então incubado com o líquido pericárdico (50 μ L) nos pHs onde foram observadas as maiores atividades enzimáticas (em tampão adequado 0,2M). Os tampões utilizados foram TRIS, fosfato de sódio e acetato de sódio em pH 8,0; 6,0 e 4,0, respectivamente, para um volume final de reação de 2,0 mL. As medidas foram realizadas na presença de inibidores enzimáticos E-64 - 1 μ M (cisteíno proteases), pepstatina A - 10 μ M (aspartil proteases), e PMSF - 0,8 mM (serino proteases), de forma a obter apenas a atividade da classe enzimática investigada. As concentrações de inibidores foram determinadas a partir de ensaios de titulação do sítio ativo da enzima na amostra utilizada e da determinação da constante de inibição.

4.3 MONITORAMENTO DA CLIVAGEM DOS SUBSTRATOS COM SUPRESSÃO INTRAMOLECULAR DE FLUORESCÊNCIA

Os substratos Abz-MISLMKRPQ-EDDnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp, que contêm a sequência N-terminal e C-terminal em torno da bradicinina, respectivamente, foram incubados com o líquido pericárdico em pH 4,0 e 8,0 para monitoramento da clivagem. O monitoramento foi feito através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de octadecilsilano (C18 - 4 x 120 mm, Merck), equilibrada com uma solução de acetonitrila (Lichrosolv, Merck) 20% em água, contendo 0,1% de ácido trifluoracético (TFA, Carlo Erba) e eluída com um gradiente feito com acetonitrila 100%, contendo TFA 0,1%. Os fragmentos de peptídeos foram detectados em 214 nm, através de espectrofotômetro UV/VIS (APD 6AV, Shimadzu) e de um monitor de fluorescência (535 HPLC Fluorescente monitor, λ_{ex} , 320 nm; λ_{em} , 420 nm, Shimadzu). O tempo de retenção de cada fragmento liberado foi comparado com aquele obtido após incubação dos mesmos substratos com a calicreína plasmática humana e uma protease ácida renal humana. A análise de aminoácidos dos fragmentos liberados foi feita após hidrólise em ácido clorídrico/ácido propiônico (Sigma, 50:50), 4,0 M, em ampolas lacradas e mantidas a 110°C durante 24h para a hidrólise. Os aminoácidos foram pré-derivatizados (BURBACH et al., 1982) com o-ftalaldeído (Merck) e submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de octadecilsilano (C18 - 4 x 120 mm, Merck), com gradiente composto por metanol Lichrosolv® 20% em tampão citrato de sódio 0,1 M (solvente A) e metanol Lichrosolv® 100% (solvente B). Os aminoácidos foram identificados a partir de um padrão de aminoácidos submetido aos mesmos procedimentos de derivatização e cromatográfico utilizados para as amostras.

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS SOBRE SUBSTRATOS SINTÉTICOS COM SUPRESSÃO INTRAMOLECULAR DE FLUORESCÊNCIA

Foram observadas atividades enzimáticas sobre todos os substratos utilizados em pHs distintos. As atividades enzimáticas mais proeminentes foram observadas em pH 3,0; 4,0; 6,0 e 8,0. Os ensaios de inibição dessas atividades com Pepstatina A, E-64 e PMSF mostraram a presença de aspartil, cisteíno e serino peptidases em todas as amostras analisadas (Tabela 1).

Tabela 1- Perfil de detecção das atividades enzimáticas presente no fluido pericárdico

pH	Substratos				Inibição
	Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp	Abz-AIKFFRLQ-Eddnp	Abz-MISLMKRPQ-Eddnp	Abz-FRSSRQ-Eddnp	
2,0	++	++	+	+	
3,0	+++	+++	+++	+++	Pepstatina A
4,0	+++	+++	+++	+++	Pepstatina A
5,0	-	+	+	+	
6,0	-	+++	-	-	E-64
7,0	-	+	+	+	
8,0	-	-	+++	+++	PMSF
9,0	-	-	++	+	

*As atividades foram expressas de forma semi-quantitativa para cada um dos substratos e a inibição realizada no pH ótimo de hidrólise

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

A atividade observada em pH 6,0 sobre o substrato Abz-AIKFFRLQ-Eddnp foi inibida por E-64, mostrando uma atividade de cisteíno protease. Entretanto, neste pH não foram observadas hidrólises dos substratos com sequências do cininogênio.

5.2 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DO FLUIDO PERICÁRDICO HUMANO SOBRE O SUBSTRATO Abz-MISLMKRPQ- Eddnp

Os resultados mostram que o fluido pericárdico humano hidrolisou os substratos relacionados ao cininogênio. Para o substrato Abz-MISLMKRPQ-Eddnp os dados obtidos foram $75 \pm 31 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ (média \pm DP) em pH ácido, e $334 \pm 161 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ (média \pm DP) em pH 8,0 (Tabela 2; ANEXO B).

Os inibidores enzimáticos foram úteis para mostrar que aspartil e serino proteases são as classes enzimáticas com potencial atividade cininogênica no fluido pericárdico.

Tabela 2 - Atividade enzimática do fluido pericárdico humano sobre Abz-MISLMKRPQ-Eddnp

	Atividade pH 4,0	Atividade Residual pH 4,0 Pepstatina A (10 μM)	Atividade pH 6,0	Atividade Residual pH 6,0 E-64 (1 μM)	Atividade pH 8,0	Atividade Residual pH 8,0 PMSF (0,8 mM)
Média \pm DP*	75 \pm 31	37 \pm 17	74 \pm 24	73 \pm 19	368 \pm 161	204 \pm 97

*Atividade expressa como $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

Como mencionado anteriormente, a atividade referente à ação de cisteíno proteases não deve gerar cininas, visto que o inibidor E-64 não foi eficiente para reduzir a atividade sobre a sequência Abz-MISLMKRPQ-Eddnp nas condições do ensaio.

5.3 MONITORAMENTO DA CLIVAGEM DOS SUBSTRATOS COM SUPRESSÃO INTRAMOLECULAR DE FLUORESCÊNCIA

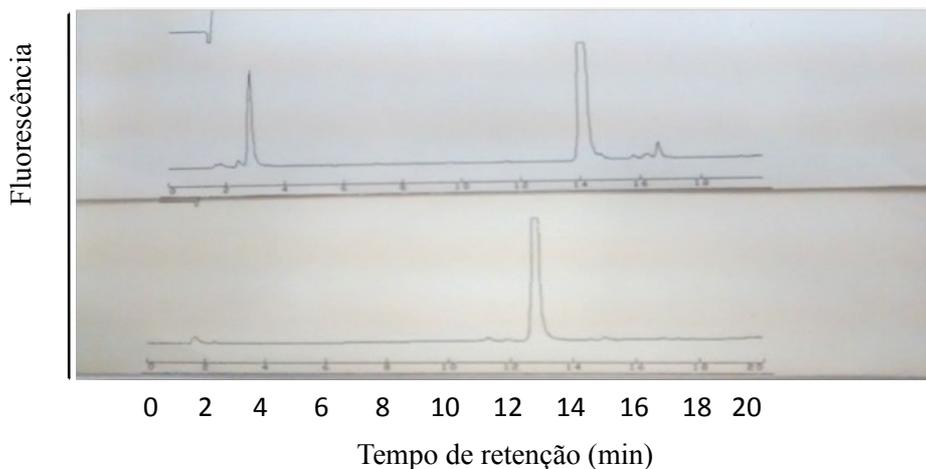
As hidrólises dos substratos Abz- MISLMKRPQ-Eddnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp, foram monitoradas por cromatografia líquida (CLAE) em pH 4,0 e 8,0.

As análises cromatográficas (CLAE) das misturas de incubação do fluido pericárdico em pH 4,0 e pH 8,0 com os substratos Abz- MISLMKRPQ-EDDnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp

foram úteis para verificar as clivagens pelas enzimas presentes no fluido e permitiram observar que em cada uma das condições de ensaio as hidrólises aconteceram em um único ponto em cada substrato.

A incubação do fluido pericárdico com o substrato Abz- MISLMKRPQ-EDDnp, em pH 8,0 mostrou um fragmento fluorescente com tempo de retenção similar àquele obtido quando da incubação do mesmo substrato com a calicreína plasmática humana. A incubação em pH 4,0 utilizando o mesmo substrato mostrou um tempo de retenção para o fragmento fluorescente similar àquele obtido pela incubação de uma protease ácida renal humana, sabidamente liberadora de metionil-lisil-bradicinina (MLBK) (Figura 2). Para o substrato Abz-FRSSRQ-Eddnp a hidrólise enzimática em pH 8,0 e 4,0 liberou um peptídeo fluorescente com idêntico tempo de retenção.

Figura 2 – Monitoramento da clivagem do substrato Abz-MISLMKRPQ-EDDnp em pH 4,0 e pH 8,0



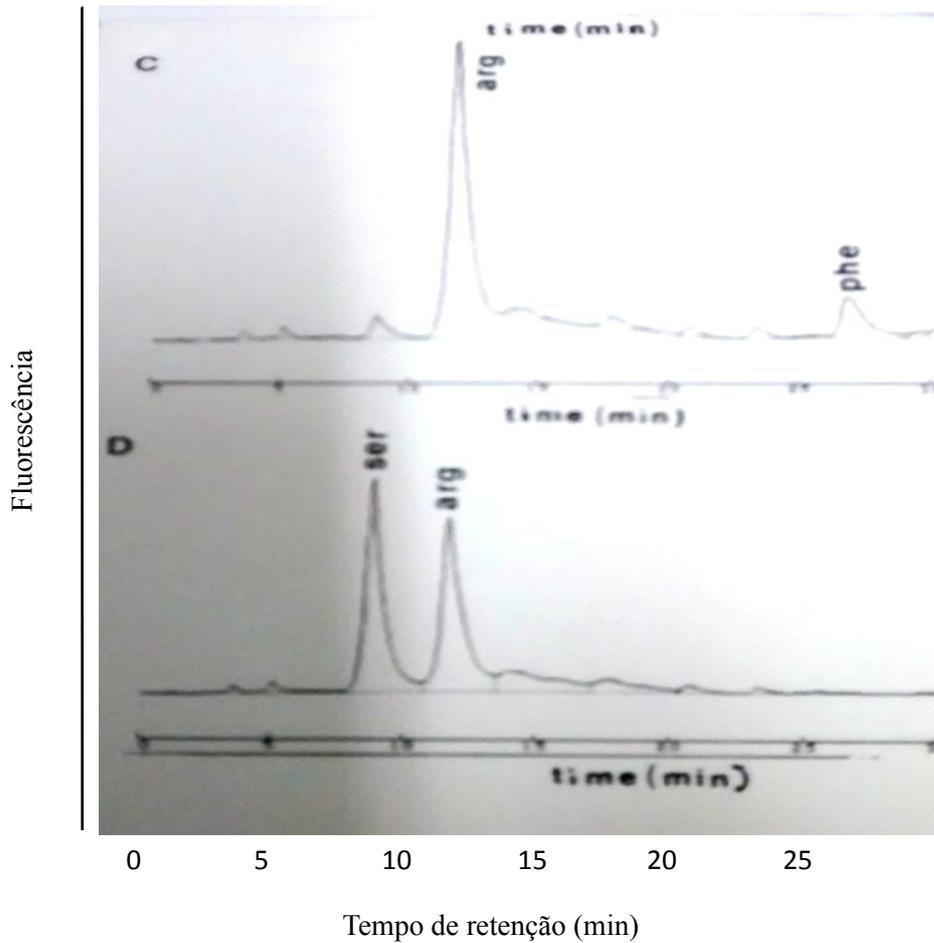
Perfil cromatográfico dos fragmentos fluorescentes liberados a partir do substrato Abz-MISLMKRPQ-Eddnp após incubação com o líquido pericárdico humano, em a) pH 8,0 (tempo de retenção 14,08 min); em b) pH 4,0 (tempo de retenção 12,87 min)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015.

As análises de aminoácidos dos fragmentos dos peptídeos obtidos após a hidrólise mostraram que em pH 8,0 as clivagens ocorreram na ligação Lis-Arg no peptídeo Abz-MISLMKRPQ-EDDnp e em Arg-Ser no substrato Abz-FRSSRQ-Eddnp, sugerindo a

liberação de bradicinina (Figura 3). Em pH 4,0 as hidrólises ocorreram nas ligações Leu-Met no peptídeo Abz- MISLMKRPQ-EDDnp e em Arg-Ser no substrato Abz-FRSSRQ-Eddnp, sugerindo a liberação de metionil-lisil-bradicinina. Estes dados estão resumidos na Tabela 3.

Figura 3 - Análise de aminoácidos dos fragmentos do substrato Abz-FRSSRQ-Eddnp em pH 8,0



Análise de aminoácidos dos fragmentos liberados após incubação do Substrato Abz-FRSSRQ-Eddnp com o fluido pericárdico (pH 8,0). Em c) fragmento fluorescente; em d) fragmento não fluorescente. O aminoácido glutamina não foi detectado.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

Tabela 3 - Pontos de hidrólise nos substratos sintéticos

pH	Substrato
4,0	↓ Abz-MISL MKRPQ-Eddnp
8,0	↓ Abz-MISLMK RPQ-Eddnp
4,0	↓ Abz-FR SSRQ-Eddnp
8,0	↓ Abz-FR SSRQ-Eddnp

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015

6 DISCUSSÃO

Este trabalho mostra, pela primeira vez, que o fluido pericárdico humano contém atividades enzimáticas relacionadas à serino, cisteíno e aspartil proteases. A hidrólise dos substratos Abz-MISLMKRPQ-Eddnp e Abz-FRSSRQ-Eddnp, contendo as sequências N e C-terminal em torno da bradicinina, sugere que o fluido pericárdico possui um potencial papel na liberação local de cininas. Observamos que as hidrólises dos substratos sintéticos ocorreram em pH ácido (em torno de 4,0) e em pH 8,0. A utilização dos inibidores pepstatina A e PMSF permitiu atribuir, pelo menos em parte, essas atividades enzimáticas às classes de aspartil e serino peptidases.

As análises cromatográficas dos fragmentos liberados, somadas aos resultados das análises de aminoácidos mostraram que além da similaridade dos tempos de retenção, a identificação dos aminoácidos, nos permitem afirmar que as quebras ocorreram nas ligações Lis-Arg na sequência N-terminal, e Arg-Ser em C-terminal, em pH 8,0. Com estes dados, é bastante provável que a atividade cininogênica em pH neutro alcalino (pH 7,4) do fluido pericárdico esteja relacionada à liberação de bradicinina.

Como as calicreínas são cininogenases do grupo das serino-proteases com específicas ações proteolíticas, e a calicreína plasmática cliva o cininogênio de alto peso molecular para gerar BK (Kaplan et al., 1998), os dados do nosso trabalho apontam para o fato de que esta atividade de serino protease presente no fluido pericárdico humano, pode ser devida à ação de enzima(s) com características de calicreína plasmática.

É importante ressaltar também, que em todas as amostras de fluido pericárdico utilizadas neste estudo foi detectada a presença de atividade enzimática inibida por PMSF e pepstatina A, em pH distintos. A atividade residual foi um parâmetro útil para mostrar que nem toda a atividade enzimática observada pode ser atribuída a uma única classe enzimática ou enzima em particular, em cada pH, visto que o fluido pericárdico foi utilizado “in natura”, sem nenhum processo de purificação prévio.

A atividade observada em pH ácido foi atribuída a enzima(s) da classe das aspartil peptidases, devido à inibição por pepstatina A, um clássico inibidor destas enzimas (Umezawa et al., 1970). As análises cromatográficas dos fragmentos liberados, e os resultados das análises de aminoácidos sugerem que as hidrólises ocorreram nas pontes Leu-Met, na sequência N-terminal, e Arg-Ser em C-terminal. Estes dados indicam que a metionil-lisil-

bradicinina (MLBK) poderia ser a cinina liberada por aspartil proteases presentes no fluido pericárdico, à semelhança de uma protease ácida de córtex renal humana (Gomes et al., 1997). A ação cininogénica desta classe enzimática neste fluido em condições fisiológicas não deve contribuir significativamente para a liberação e para o conteúdo de cininas, visto que o pH neste local se assemelha ao pH plasmático. Por outro lado, outras atividades relacionadas ao remodelamento tecidual e atribuídas em parte às aspartil peptidases (Margaryan et al., 2010), podem justificar sua presença neste local.

Cininogénases ácidas foram descritas por Zeitlin et al. (1989) e por Moshi et al. (1995) que purificaram, a partir de ventrículo esquerdo de cães, uma protease com atividade de catepsina D, com capacidade de clivar cininogênio de baixo peso molecular liberando cinina, sugerindo que a liberação de cininas nas condições ligeiramente ácidas da isquemia do miocárdio pode ter um papel protetor. Linz et al. (1996) mostrou, em corações isolados de ratos, que a liberação de cininas é aumentada durante a isquemia, exercendo efeitos benéficos como a redução da duração e da incidência de fibrilação ventricular.

Nas condições de ensaio das amostras de fluido pericárdico utilizadas em nosso trabalho não foi possível identificar atividade cininogénica relacionada a cisteíno peptidases.

Durante processos inflamatórios, uma grande quantidade de cisteíno proteases lisossômicas são lançadas no líquido extracelular. Conseqüentemente, a hidrólise de cininogênio por esta classe de enzimas poderia representar uma via alternativa para produção de cininas em condições de pericardites ou outras afecções da membrana pericárdica e/ou do miocárdio subjacente. A atividade cininogénica das cisteíno proteases catepsina L e catepsina B tem sido demonstrada em experiências *in vitro* (Puzer et al., 2005).

Nossos dados demonstram que o fluido pericárdico humano possui enzimas com atividade hidrolítica de ligações peptídicas contidas no segmento do cininogênio, em torno da bradicinina, reforçando o potencial papel do fluido pericárdico na liberação de cininas. Sabendo da importância da ação das cininas no tônus vascular e também da localização estratégica do fluido pericárdico junto ao miocárdio e vasos sanguíneos do coração, a liberação de cininas neste fluido pode representar uma via de controle e regulação do tônus vascular local.

Dados da literatura já mostraram o envolvimento do sistema caliceína-cinina (KKS) no controle de tônus muscular liso e pressão arterial, desempenhando um efeito cardioprotetor

significativo. Distúrbios neste sistema estão associados à hipertensão arterial, isquemia do miocárdio e outras complicações clínicas (Marcondes; Antunes, 2005).

Segundo Mebazza et al. (1998), mediadores da função cardiovascular, liberados por células mesoteliais pericárdicas ou difundidos através dos tecidos cardíacos para o espaço pericárdico, poderiam ser concentrados e subseqüentemente liberados até o miocárdio e ou vasos sanguíneos. Sendo assim, o fluido pericárdico parece atuar como um importante reservatório de mediadores que podem modular as funções das células cardíacas. Nesse estudo Mebazza et al. (1998) demonstrou, pela primeira vez, que o líquido pericárdico exerce um efeito sobre a função dos miócitos cardíacos, além de mostrar que os mediadores vasoativos como prostaglandinas (PG), NO e catecolaminas no espaço pericárdico pode alterar a função cardiovascular, tanto local quanto sistêmica.

Nosso trabalho mostra pela primeira vez a presença de enzimas com potencial atividade cininogenásica no fluido pericárdico humano. Os resultados obtidos ainda não permitem a identificação das cininas liberadas por Serino e Aspartil peptidases presentes no fluido pericárdico. A presença de enzimas de sistemas cininogenases-cininas no fluido pericárdico corrobora as afirmações de que o controle local na liberação de peptídeos biologicamente ativos pode contribuir com a regulação de processos biológicos importantes na manutenção da homeostase cardiovascular.

Não foi nosso intuito neste estudo, estabelecer valores de referência para as atividades enzimáticas no fluido pericárdico, mas a partir da sua detecção determinar o potencial de geração de cininas neste local. A origem das enzimas e a existência de cininogênios no fluido pericárdico ainda não foram determinadas.

7 CONCLUSÃO

- O fluido pericárdico apresenta atividade enzimática das classes de serino, aspartil e cisteíno peptidases;
- Enzimas das classes de serino e aspartil peptidases hidrolisaram peptídeos com apagamento intramolecular de fluorescência contendo sequências peptídicas em torno da bradicinina, sugerindo uma potencial atividade cininogenásica para o fluido pericárdico;
- Nas condições de ensaio utilizadas não foi possível identificar atividade cininogenásica relacionada a cisteíno peptidases.
- A análise cromatográfica dos peptídeos e de aminoácidos dos fragmentos liberados após as hidrólises permitiu observar que cada um dos substratos foi clivado em uma única ligação.
- Em pH 4,0 os produtos fluorescentes foram similares aos fragmentos obtidos da hidrólise por uma protease ácida renal que libera MLBK do cininogênio humano.
- Em pH 8,0 os produtos de hidrólise apresentaram tempos de retenção comparáveis aos obtidos para a caliceína plasmática, sugerindo a liberação de bradicinina.
- Ainda não podemos afirmar se este fluido contém substratos para a atividade cininogenásica e se as cininas liberadas localmente tem significância fisiológica

REFERÊNCIAS

Araki H, Takenaka F. An increase of cathepsin D activity in cardiac lymph and pericardial fluid induced by experimental myocardial ischemia in the dog. **Life Sciences**, Japan, v. 17, p.613-618, 1975.

Bechtloff R, Goette A, Bukowska A, Kahne T, Peters B, Huth C, Wolke C, Lendeckel U. Gender and age-dependent differences in the bradykinin-degradation within the pericardial fluid of patients with coronary artery disease. **International Journal of Cardiology**, Alemanha, v.146, p.164-170, 2011.

Bockmann S, Paegelow I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **J Leukoc Biol**, Alemanha, v.68, p.587–592, 2000.

Burbach JPH, Arie P, Lebouille JLM, Verhoef J, Witter A. Sensitive and rapid amino acid analysis of peptide hydrolysates by high performance liquid chromatography of o-phthalaldehyde derivatives. **Journal of Chromatography**, v.237, p.339-343, 1982.

Chao J, Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. **Exp Physiol**, Charleston, SC, v.90, p.291–298, 2005.

Chao J, Li H J, Yao Y Y, Shen B, Gao L, Bledsoe G et al. Kinin infusion prevents renal inflammation, apoptosis, and fibrosis via inhibition of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase activity. **Hypertension**, Dallas, TX, v.49, p.490-497, 2007.

Chagas JR, Prado ES, Juliano L. **Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins**. Analytical Biochemistry 1991;192, 419-425.

Cheng X W, Shi GP, Kuzuya M, Sasaki T, Okumura K, Murohara T. Role for Cysteine Protease Cathepsins in Heart Disease: Focus on Biology and Mechanisms With Clinical Implication. **Circulation**, Nagoya, Japan, v.125, p. 1551-1562, 2012.

Coats AJS. Pericardial Fluid – dispensable or indispensable fluid and an example of patentable bio-diversity. **International journal of cardiology**, [S.I.], v.77, p.109-111, 2001.

Corda S, Mebazaa A, Gandolfini M, Fitting C, Marrotte F, Peynet J, Charlemagne D, Cavaillon J, Payen D, Rappaport L, Samuel J. Trophic Effect of Human Pericardial Fluid on Adult Cardiac Myocytes. **Circulation Research**, France, v.81, p.679-687, 1997.

Cruden N L, Newby D E. Clots, kinins and coronaries. **Atherosclerosis**, Edinburgh, UK, v.183, p. 189–198, 2005.

Czum JM, Silas AM, Althoen MC. Evaluation of the Pericardium with CT and MR. **ISRN Cardiology**, USA, v.2014, 2014.

Drinker CK, Field ME. Absorption from the pericardial cavity. **The J of Exp Medicine**, v.53, 1931.

Fernández AL, García-Bengochea JB, Alvarez J, Juanatey JRG. Biochemical markers of myocardial injury in the pericardial fluid of patients undergoing heart surgery. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, Santiago de Compostela, Spain, v.7, p.373-377, 2008.

Gardner E, Gray DJ, Rahilly R. **Anatomia**. 4. ed. Guanabara Koogan, 1988. 816p.

Gibson AT, Segal MB. A Study of the composition of pericardial fluid, with special reference to the probable mechanism of fluid formation. **J Physiol**, London, v.277, p.367-377, 1978.

Gomes R A S, Juliano S, Chagas JR, Hial V. Characterization of kininogenase activity of an acidic proteinase isolated from human Kidney. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Uberaba, v.75, p.757-761, 1997.

Gomes RAS, Juliano S, Chagas JR, Hial V. Met-Lys-Bradykinin-Ser, the kinin released from human kininogen by human pepsin. **Immunopharmacology**, Uberaba, v.32, p.76-79, 1996

Gomes R A S, Teodoro LGVL, Lopes ICR, Bersanetti PA, Carmona AK, Hial V. Enzima conversora de angiotensina no líquido pericárdico: estudo comparativo com a atividade sérica. **Arq. Bras. Cardiol**, Uberaba, v.91, p.172-178, 2008.

Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. **Pharmacol Rep**, Kraków, Poland, v.60, p.3-11, 2008.

Heitsch H. The therapeutic potential of bradykinin B2 receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease. **Expert Opin Investig Drugs**, Frankfurt, Germany, v.12, p. 759–770, 2003.

Hial V, Gimbrone JR MA, PEYTON MP, WILCOS GM, PISANO JJ. Angiotensin metabolism by cultured human vascular endothelial and smooth muscle cells. **Microvasculature Research**, v.17, p.314-329, 1979.

Holt JP. The normal pericardium. **Am J Cardiol**, v.26, p.455-465, 1970.

Imazio M. Pericarditis: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. **Curr Infect Dis Rep**, Torino, Italy, v.13, p.308-316, 2011.

Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanami O, Roberts WC. Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. **Am J Cardiol**, v.46, p.744-753, 1980.

Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Roberts WC. Structure of bovine parietal pericardium and of unimplanted Ionescu-Shiley pericardial valvular bioprostheses. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.81, n. 5, p.747-57, 1981.

Ji H, Nie H. Electrolyte and Fluid Transport in Mesothelial Cells. **J Epithel Biol Pharmacol**, v.1, p. 1–7, 2008.

Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Nakazawa Y, Ghebrehiwet B, Reddigari S, Silverberg M. Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. **Clin Rev Allergy Immunol**, v.16,p.403-429, 1998.

Kaplan AP, Joseph K, Silverberg M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **J Allergy Clin Immunol**, USA, v.2, p.195-209, 2002.

Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovych V, Skidgel R A. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. **Neuropeptides**, Chicago, USA, v.44, p. 145–154, 2010.

Limana F, Bertolami C, Mangoni A, DI Carlo A, Avitabile D, Mocini D, Ianelli P, DE Mori R, Marchetti C, Pozzoli O, Gentili C, Zacheo A, Germani A, Capogrossi MC. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit+ cells: Role of the pericardial fluid. **J of Mol and Cellular Cardiology**, v.48, p.609–618, 2010.

Limana F, Capogrossi MC, Germani A. The epicardium in cardiac repair: From the stem cell view. **Pharm & Therap**, v.129, p.82–96, 2011.

Linz W, Martorana PA, Wiemer G, Wirth K, Schölkens BA. Role of kinins in myocardial ischemia. **EXS.**, v.76, p.231-241, 1996.

Linz W, Wohlfart P, Scholkens BA, Malinski T, Wiemer G. Interactions among ACE, kinins and NO. **Cardiovasc Res**, Frankfurt/Main, Germany, v.43, p.549–561, 1999.

Madeddu P, Emanuelli C, El-Dahr S. Mechanisms of disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. **Nat Clin Pract Nephrol**, Bristol, UK, v.3, p.208–221, 2007.

Marcondes S, Antunes E. The Plasma and Tissue Kininogen-kallikrein-kinin System: Role in the Cardiovascular System. **Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular & Hematological Agents**, Campinas, v.3, p.33-44, 2005.

Margaryan NV, Kirschmann DA, Lipavsky A, Bailey CM, Hendrix MJ, Khalkhali-Ellis Z. New insights into cathepsin D in mammary tissue development and remodeling. **Cancer Biol Ther**. 2010 Sep 1;10(5):457-66. Epub 2010 Oct 1. Chicago, Illinois USA.

Maurer FW, Warren MF, Drinker CK. The composition of mamalian pericardial and peritoneal fluids. Studies of their protein and chloride contents, and the passage of foreign substances from the blood stream into these fluids. **Am J Physiol**, v.129, p.635-644, 1940.

Mebazaa A, Wetzel RC, Dodd-o JM, Redmond EM, Shah AM, Maeda K, Maistre G, Lakatta EG, Robotham JL. Potential paracrine role of the pericardium in the regulation of cardiac function. **Cardiovascular Research**, USA, v.40, p.332-342, 1998.

Moshi MJ, Zeitlin IJ, Parratt JR. An acidic kininogenase in rat ventricular myocardium. **J Cardiovasc Risk**, v.2, p.331-337, 1995.

Moshi MJ, Zeitlin IJ, Wainwright CL, Parratt JR. Acid optimum kininogenases in canine myocardium and aorta. **Cardiovasc Res**, Glasgow, United Kingdom, v.26, p.367-370, 1992.

Oyama J, Shimokawa H, Morita S, Yassui H, Takeshita A. Elevated interleukin-1 β in pericardial fluid of patients with ischemic heart disease. **Coronary artery disease**, Japan, v.12, p.567-571, 2001.

Oza NB, Schwartz JH, Goud HD, Levinsky NG. Rat Aortic Smooth Muscle Cells in Culture Express Kallikrein, Kininogen, and Bradykininase Activity. **J. Clin. Invest.**, Boston, Massachusetts, v.85, p.597-600, 1990.

Pathak M, Wong SS, Dreveny I, Emsley J. Structure of plasma and tissue kallikreins. **Thromb Haemost**, Nottingham, v.110, p.423–433, 2013.

Puzer L, Vercesi J, Alves MFM, Barros NMT, Araujo MS, Juliano M A, Reis ML, Juliano L, Carmona AK. A possible alternative mechanism of kinin generation *in vivo* by cathepsin L. **Biol. Chem.**, São Paulo, v.386, p.699–704, 2005.

Qin Y, Shi GP. Cysteinyl cathepsins and mast cell proteases in the pathogenesis and therapeutics of cardiovascular diseases. **Pharmacol Ther**, Beijing, China, v.131, p.338–350, 2011.

Regoli D, Plante G E, Gobeil jr.F. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, Ferrara, Italy, v.135, p.94–111, 2012.

Regoli D. Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. **Curr Pharm Des**, Québec, Canada, v.10, p.1667–1676, 2004.

Rhaleb N E, Yang XP, Carretero OA. The Kallikrein-Kinin System as a Regulator of Cardiovascular and Renal Function. **Compr Physiol**, Detroit, Michigan, USA, v.1, p.971–993, 2011.

Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S, Langner J. Immunophenotype of Lymphocytes in Pericardial Fluid from Patients with Different Forms of Heart Disease. **Int Arch Allergy Immunol**, Halle, FRG, v.194, p.48-56, 1994.

Santos D R, Calixto JB, Souza G E. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. **Br J Pharmacol**, Ribeirão Preto, SP, v.139, p. 271–278, 2003.

Schmaier AH, McCrae K R. The plasma kalikrein-kinin system: its evolution from contact activation. **J. Thromb Haemost**, Cleveland, USA, v.5, p.2323-2329, 2007.

Sharma J N. Cardiovascular activities of the bradykinin system. **The Scientific World Journal**, Kuwait, v.8, p. 384–393, 2008.

Shikama N, Terano T, Hirai A. A case of rheumatoid pericarditis with high concentrations of interleukin-6 in pericardial fluid. **Heart**, Japan, v. 83, p.711–712, 2000.

Tambara K, Fujita M, Nagaya N, Miyamoto S, Iwakura A, Doi K, Sakaguchi G,

Nishimura K, Kangawa K, Komeda M. Increased pericardial fluid concentrations of the mature form of adrenomedullin in patients with cardiac remodelling. **Heart**, Japan, v. 87, p.242–246, 2002.

Tanaka T, Hasegawa K, Fujita M, Tamaki S, Yamazato A, Kihara Y, Nohara R, Sasayama S. Marked Elevation of Brain Natriuretic Peptide Levels in Pericardial Fluid Is Closely Associated With Left Ventricular Dysfunction. **J Am Coll Cardiol**, Japan, v.31, p.399–403, 1998.

Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et Biophysica Acta**, Ljubljana, Slovenia, v.1824, p.68-88, 2012.

Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M, Takeuchi T. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. **J. Antibiotics**, v.23, p. 259-262, 1970

Vanhoutte P M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circ J**, Hong Kong, China, v.73, p.595–601, 2009.

Wang Z, Li M, Li J. Recent Advances in the Research of Lymphatic Stomata. **The Anatomical Record**, v.293, p.754–761, 2010.

Watanabe M, Kawaguchi S, Nakahara H, Hachimaru T. The Roles of Natriuretic Peptides in Pericardial Fluid in Patients with Heart Failure. **Clin. Cardiol**, Japan, v.32, p.159–163, 2009.

Xiang F, Guo X, Chen W, Wang J, Zhou T, Huang F, Cao C, Chen X. Proteomics analysis of human pericardial fluid. **Proteomics Journal**, Nanjing, China, v.13, p.2692-2695, 2013.

Zeitlin IJ, Fagbemi SO, Parratt JR. Enzymes in normally perfused and ischaemic dog hearts which release a substance with kinin like activity. **Cardiovasc Res**, v.23, p.91-97, 1989.

ANEXO A - Dados dos pacientes submetidos à intervenção cirúrgica cardíaca

Nº Protocolo	Idade (anos)	Sexo	Intervenção
01	59	M	Revascularização coronária
02	62	M	Cirurgia da aorta torácica
03	54	F	Cirurgia valvar simples
04	59	M	Revascularização coronária
05	69	M	Revascularização coronária
06	65	F	Cirurgia da aorta torácica
07	58	F	Revascularização coronária
08	65	F	Revascularização coronária
09	57	M	Revascularização coronária
10	72	M	Cirurgia valvar múltipla
11	68	F	Cirurgia valvar simples
12	67	M	Revascularização coronária
13	56	M	Cirurgia da aorta torácica
14	69	M	Revascularização coronária
15	66	M	Revascularização coronária
16	57	M	Revascularização coronária
17	54	M	Cirurgia da aorta torácica
18	61	F	Revascularização coronária
19	67	F	Revascularização coronária
20	60	M	Revascularização coronária
21	55	M	Revascularização coronária
22	67	M	Revascularização coronária
23	61	F	Cirurgia valvar simples

F-Feminino M-Masculino

ANEXO B - Atividades enzimáticas do fluido pericárdico humano sobre o substrato Abz-MISLMKRPQ- Eddnp em pH 4,0, 6,0 e 8,0

N° Protocolo	Atividade pH 4,0	Atividade Residual (pH 4,0)	Atividade pH 6,0	Atividade Residual (pH 6,0)	Atividade pH 8,0	Atividade Residual (pH 8,0)
		Pepstatina A (5 µM)		E-64 (5 µM)		SBTI (5 µM)
01	125	67 (53)	131	119 (91)	264	125 (47)
02	64	39 (61)	72	65 (90)	331	185 (56)
03	72	25 (35)	68	72 (106)	521	350 (67)
04	68	36 (53)	69	63 (91)	483	300 (62)
05	67	45 (67)	71	77 (108)	462	250 (54)
06	70	30 (43)	65	70 (107)	258	170 (66)
07	124	85 (68)	112	100 (89)	871	485 (56)
08	51	28 (55)	45	52 (115)	191	92 (48)
09	91	52 (57)	84	79 (94)	368	175 (47)
10	101	61 (60)	92	97 (105)	597	310 (52)
11	72	37 (51)	74	68 (92)	259	170 (66)
12	148	62 (42)	117	109 (93)	407	205 (50)
13	60	25 (41)	65	62 (95)	227	135 (59)
14	30	20 (66)	41	45 (110)	247	142 (57)
15	75	39 (52)	76	72 (95)	395	202 (51)
16	52	30 (57)	61	67 (110)	517	320 (62)
17	56	41 (73)	65	59 (91)	457	272 (59)
18	134	52 (39)	120	105 (87)	188	85 (45)
19	60	25 (42)	55	58 (105)	297	128 (43)
20	61	37 (60)	63	67 (106)	359	165 (46)
21	42	20 (47)	50	53 (106)	192	102 (53)
22	52	32 (61)	61	67 (110)	349	185 (53)
23	51	37 (72)	55	50 (91)	230	145 (63)
Média ± DP	75 ±31	37 ±17	74 ±24	73±19	368 ±161	204 ± 97

*Atividades enzimáticas expressas como $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ e atividade enzimática residual expressa como $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ (%)