

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO – UFTM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

KAIKY NEVES DE AQUINO ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA ASPARTIL PEPTIDASE DO FLUIDO
PERICÁRDICO HUMANO UTILIZANDO PEPTÍDEOS FLUORESCENTES EM
TORNO DA SEQUÊNCIA DO SÍTIO REATIVO DA CALISTATINA**

UBERABA - MG

2022

KAIKY NEVES DE AQUINO ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA ASPARTIL PEPTIDASE DO FLUIDO
PERICÁRDICO HUMANO UTILIZANDO PEPTÍDEOS FLUORESCENTES EM
TORNO DA SEQUÊNCIA DO SÍTIO REATIVO DA CALISTATINA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas área I – Bioquímica, Fisiologia e
Farmacologia da Universidade Federal Do
Triângulo Mineiro.

Orientadora(a): Prof.^a Dra. Roseli Aparecida Da
Silva Gomes

UBERABA - MG

2022

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

A479c Alves, Kaiky Neves de Aquino
Caracterização de uma aspartil peptidase do fluido pericárdico humano utilizando peptídeos fluorescentes em torno da sequência do sítio reativo da calistatina / Kaiky Neves de Aquino Alves. -- 2022.
53 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022
Orientadora: Profª. Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes

1. Ácido aspártico proteases. 2. Líquido pericárdico. 3. Inibidores enzimáticos. I. Gomes, Roseli Aparecida da Silva. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 577.112.384

KAIKY NEVES DE AQUINO ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA ASPARTIL PEPTIDASE DO FLUIDO
PERICÁRDICO HUMANO UTILIZANDO PEPTÍDEOS FLUORESCENTES EM
TORNO DA SEQUÊNCIA DO SÍTIO REATIVO DA CALISTATINA**

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

Orientadora(a): Prof.^a Dra. Roseli Aparecida Da Silva Gomes

UBERABA, 14 DE JULHO DE 2022.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. ROSELI APARECIDA DA SILVA GOMES –
Orientador(a) Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.^a Dra. LÍVIA DAS GRAÇAS VIEITO LOMBARDI TEODORO
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.^a Dra. DANIELA PEREIRA GARÇON
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Documento assinado eletronicamente por **ROSELI APARECIDA DA SILVA GOMES**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANIELA PEREIRA GARCON**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art.34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **LIVIA DAS GRACAS VIEITO LOMBARDI TEODORO**, **Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0782016** e o código CRC **0DB2DE4B**.

Este trabalho foi realizado com o suporte financeiro das seguintes instituições:

Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CPNQ (Proc. 471134/2003-1)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (CBB 2111/97; APQ-01650-08)

Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba – FUNEPU

Dedico este trabalho à minha mãe
Lucelia Neves e a minha família.

AGRADECIMENTOS

À Professora Roseli Aparecida da Silva Gomes, pelo auxílio na realização deste trabalho, pela confiança em mim depositada, por todo o conhecimento compartilhado e pela sua orientação sobre o caminho da ciência e pesquisa.

Aos professores Luiz Juliano e Maria Aparecida Juliano do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) pela doação dos substratos sintéticos utilizados para realização da pesquisa.

Ao funcionário do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Rhéltheer de Paula Martins, pelo auxílio na realização das técnicas, pelo dia a dia no laboratório e por todo o apoio a mim oferecido.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Elisabete Perez Caramori Ambrosio, pelo carinho e acolhimento, por não medir esforços em me atender e estar sempre disposta a me ajudar.

Aos colegas da pós-graduação, em especial Dôuglas Caixeta Nunes e Roberta Soares Emrich, pois juntos trilhamos uma etapa importante de nossas vidas sempre auxiliando uns aos outros.

Especialmente:

À Deus, por me dar a oportunidade de aprender em meio a diversidade em um ano repleto de desafios e me abençoar todos os dias, colocando pessoas especiais em minha vida.

À minha mãe Lucelia Neves, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as minhas decisões, sem ela eu não teria a oportunidade de me tornar o profissional no qual estou me tornando.

À Patrícia Peres Polizelli e Jéssica de Araújo Zanoni por todo o apoio, acolhimento e conhecimento transmitido.

À minha família por todo o apoio, amor e carinho.

RESUMO

Apesar de apresentarem similaridades estruturais, homologias de sequências e mecanismo catalítico comum para a hidrólise de seus substratos, as aspartil peptidases são enzimas que apresentam preferências bem distintas no que se refere às interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico. Essas diferenças são importantes do ponto de vista biológico, porque em cada tecido/célula há condições e necessidades metabólicas próprias, de acordo com os componentes químicos/bioquímicos disponíveis no meio, tais como substratos, cofatores, inibidores e produtos. Neste estudo, uma aspartil peptidase do fluido pericárdico humano foi purificada através de etapas cromatográficas e os parâmetros cinéticos foram determinados de acordo com cada substrato sintético modificado no sítio reativo da calistatina. A enzima isolada apresentou uma massa molecular aparente de 141 kDa e a atividade de aspartil peptidase foi observada apenas nessa região de massa molecular. Os dados obtidos da cinética enzimática nos mostraram que a mudança na posição do aminoácido P₁' influenciou significativamente na sua atividade. Utilizamos esses dados para um estudo comparativo com dados observados para outras peptidases aspárticas humanas isoladas de outras fontes utilizando o mesmo conjunto de substratos obtidos nas mesmas condições de ensaio e a isoforma pericárdica de aspartil peptidase apresentou maior semelhança catalítica com a catepsina D hepática quando comparada à enzima isolada de baço. A hidrólise de sequências do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano sugere que a enzima pode interferir em processos fisiológicos onde a calistatina esteja envolvida.

Palavra-chave: Aspartil Peptidase; Fluido Pericárdico; Calistatina; Cinética Enzimática.

ABSTRACT

Despite having structural similarities, sequential homologies and a common catalytic mechanism for the hydrolysis of their substrates, aspartyl peptidases are enzymes that have very different preferences regarding interactions between amino acid residues at the catalytic site. These differences are important from a biological point of view, because each tissue/cell has its own metabolic conditions and needs, according to the chemical/biochemical components available in the medium, such as substrates, cofactors, inhibitors and products. In this study, an aspartyl peptidase from human pericardial fluid was purified through chromatographic steps and the kinetic parameters were determined according to each synthetic substrate modified at the reactive site of calistatin. The isolated enzyme had an apparent molecular mass of 141 kDa and the aspartyl peptidase activity was observed only in this molecular mass region. The data obtained from enzymatic kinetics showed us that the change in the position of the P1' amino acid significantly influenced its activity. We used these data for a comparative study with observed data for other human aspartic peptidases isolated from other sources using the same set of substrates obtained under the same assay conditions and the aspartyl peptidase's pericardial isoform showed greater catalytic similarity with hepatic cathepsin D when compared to enzyme isolated from spleen. The calistatin reactive site sequences' hydrolysis by aspartyl peptidase from human pericardial fluid suggests that the enzyme may interfere with physiological processes in which calistatin is involved.

Keywords: Aspartyl Peptidase; Pericardial Fluid; Calistatin; Enzymatic Kinetics.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Designação de Schechter e Berger. Sítios de ligação do substrato no sítio ativo da enzima (S ₄ a S ₃ ´); resíduos de aminoácidos do substrato (P ₄ a P ₃ ´)	17
Figura 2. Cromatografia em coluna de resina Q-Sepharose® (Pharmacia)	36
Figura 3. Cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia).....	37
Figura 4. Eletroforese em gel poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	38
Figura 5. Estimativa da massa molecular aparente por cromatografia de filtração em gel em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia).	39
Figura 6. Titulação do sítio ativo com pepstatina A.....	40
Figura 7. Gráfico de Michaelis-Menten e duplo recíproco de Lineweaver-Burk Abz-AIKFFSRQ-Eddnp	41
Figura 8. Gráfico de Michaelis-Menten e duplo recíproco de Lineweaver-Burk Abz-AIAFFSRQ-Eddnp	42
Figura 9. Gráfico de Michaelis-Menten e duplo recíproco de Lineweaver-Burk Abz-AILFFSRQ-Eddnp.	42
Figura 10. Gráfico de Michaelis-Menten e duplo recíproco de Lineweaver-Burk Abz-AISFFSRQ-Eddnp.....	43

ÍNDICES DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros para construção da curva a partir da solução de soroalbumina bovina 0,1 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%)24
- Tabela 2.** Parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para a hidrólise dos substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase isolada do fluido pericárdico humano.....41
- Tabela 3.** Parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para a hidrólise dos substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase isolada do fluido pericárdico humano e de peptidases aspárticas humanas isoladas de outras fontes43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δf - Variação de fluorescência

°C - Grau centígrado

nM - Nanomolar

μm - Micrômetro

μL - Microlitro

μM - Micromol

Abz - Ácido *o*-benzóico

AHM - Ácido 4-amino-3-OH-6-metil-heptanóico

Ala - Alanina

Arg - Arginina

Asp - Aspartato (ácido aspártico)

BK - Bradicinina

Eddnp - Etilenodiaminodinitrofenol

g - Gramas

Gln - Glutamina

Gly - Glicina

HCl - Ácido clorídrico

His - Histidina

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

Ile - Isoleucina

K_{cat} - Constante Catalítica

kDa - Quilodaltons

KLK -.Calicreína

K_M - Constante de Michaelis

L - Litro

Lys - Lisil-bradicinina

Leu - Leucina

Lys - Lisina

M - Molar

mg - Miligrama

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

mL - Mililitro
mm - Milímetro
NaOH - Hidróxido de sódio
NaCl - Cloreto de sódio
nm - nanômetro
Nph - Nitrofenilalanina
pH - Potencial hidrogeniônico
Phe - Fenilalanina
Pro - Prolina
PSA - Persulfato de amônio
q.s.p - Quantidade suficiente para
RCL - Alça do centro reativo
S - Substrato
Rpm - Rotações por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Dodecilsulfato de sódio de poliacrilamida
Ser - Serina
TEMED - N-N-N-N tetrametilenodiamina
UV - Ultravioleta
V - Volts
Val - Valina
 $V_{\text{máx}}$ - Velocidade máxima
 λ_{Ex} - Comprimento de onda de excitação
 λ_{Em} - Comprimento de onda de emissão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Peptidases Aspárticas.....	16
1.1.2. Peptidases Aspárticas e Importância Biológica.....	17
1.1.3. O Fluido Pericárdico.....	18
1.1.4. A Calistatina.....	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. HIPÓTESE	22
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivos gerais.....	22
4.2. Objetivos específicos.....	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1. Obtenção do fluido pericárdico.....	23
5.2. Obtenção da enzima purificada.....	23
5.2.1. Dosagem de proteínas.....	23
5.2.2. Cromatografia em coluna de resina Cibacron blue agarose® (Bio-Rad).....	24
5.2.3. Cromatografia em coluna de resina Q-Sepharose® (Pharmacia).....	25
5.2.4. Cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia).....	25
5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	26
5.4. Preparo dos géis	26
5.5. Tampões utilizados.....	27
5.6. Coloração dos géis pela prata amoniacal.....	28
5.6.1. Soluções utilizadas na coloração.....	29
5.7. Estimativa da massa molecular aparente por cromatografia de filtração em gel em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia).....	30
5.8. Determinação das constantes catalíticas.....	31

5.8.1. Substratos Sintéticos.....	31
5.8.2. Determinação do pH ótimo.....	31
5.8.3. Determinação dos pontos de clivagem.....	32
5.8.4. Análise de aminoácidos pelo método da pré-derivatização.....	32
5.8.5. Determinação das constantes catalíticas K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M	33
5.8.6. Titulação do sítio ativo com pepstatina A.....	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1. Purificação.....	34
6.1.1. Obtenção do fluido pericárdico.....	34
6.1.2. Dosagem de proteínas.....	34
6.1.3. Cromatografia em coluna de resina Cibacron blue agarose® (Bio-Rad).....	35
6.1.4. Cromatografia em coluna de resina Q-Sepharose® (Pharmacia).....	36
6.1.5. Cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia).....	37
6.1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	38
6.2. Características físico-químicas.....	39
6.2.1. Estimativa da massa molecular aparente por cromatografia de filtração em gel em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia).....	39
6.2.2. Determinação do pH ótimo.....	39
6.2.3. Titulação do sítio ativo com pepstatina A.....	40
6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para hidrólise de substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina.....	40
7. DISCUSSÃO.....	44
8. CONCLUSÕES.....	47
9. REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP.....	54
APÊNDICE A - Artigo submetido.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptidases Aspárticas

As aspartil peptidases são largamente distribuídas na natureza, desde vírus a animais superiores, suas funções vão desde a digestão inespecífica de proteínas até processos especializados de hidrólise de substratos proteicos. Na família das peptidases aspárticas A1, estão incluídas a maioria das endopeptidases aspárticas encontradas no organismo humano que são mecânica e estruturalmente relacionadas (Rawlings ND, Tolle DP, Barret AJ, 2004). Fazem parte desta família as peptidases aspárticas gástricas (pepsina, gastricsina e quimosina), lisossomais (catepsina D), não lisossomais (catepsina E), renais (renina), fúngicas (penicilopepsina) e retrovirais (Tang J, Wong RN, 1987; Kay J, Dunn BM, 1990; Dunn BM, 2002). Quase todas as enzimas desta família atuam em pH ácido (Tang J, Wong RN, 1987) e são inibidas por pepstatina A, um inibidor específico e competitivo, que se liga fortemente aos resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo (Marciniszyn J Jr, Hartsuck JÁ, Tang J, 1976).

Aspartil peptidases apresentam, caracteristicamente, um centro ativo altamente conservado, contendo dois resíduos de ácido aspártico participando do mecanismo catalítico (Pearl L, Blundell T, 1984; Cooper JB et al., 1990; Dunn BM, 2002). A ligação das aspartil peptidases aos substratos ocorre em uma fenda capaz de interagir com até sete resíduos de aminoácidos da enzima (S_4 a S_3') de acordo com a designação de Schechter e Berger (Schechter I, Berger A, 1967). Ainda como característica, os substratos devem possuir cadeias mais estendidas e cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (Powers JC, Harley AD, Myers DV, 1977) interagindo nos subsítios S_1 e S_1' da enzima, modelo frequentemente utilizado na proposta de síntese de substratos específicos para aspartil peptidases (Dunn BM et al., 1995).

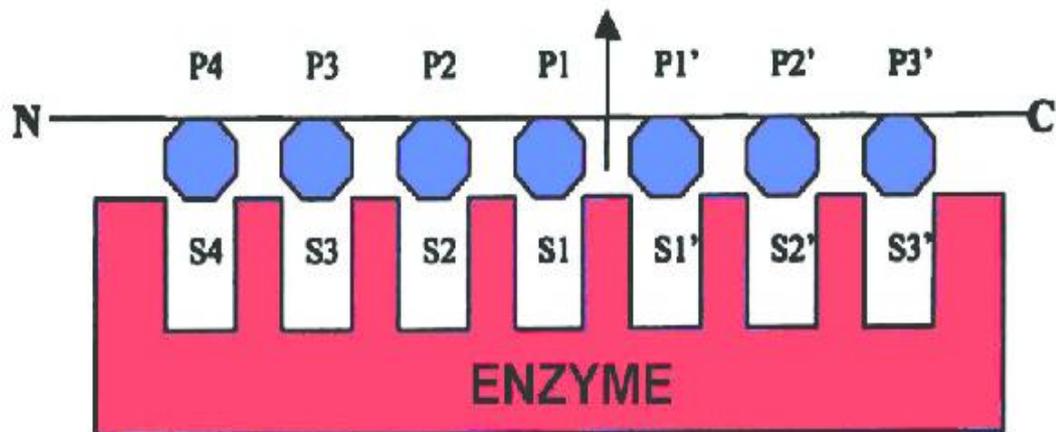


Figura 1. Designação de Schechter e Berger. Sítios de ligação do substrato no sítio ativo da enzima (S₄ a S₃′); resíduos de aminoácidos do substrato (P₄ a P₃′). A seta indica o ponto de clivagem (Schechter I, Berger A, 1967).

Apesar de apresentarem similaridades estruturais, homologias de sequências e mecanismo catalítico comum para a hidrólise de seus substratos, as peptidases aspárticas possuem peculiaridades que vão desde uma característica secretória (pepsina, gastricsina e renina) até mecanismos de ativação, pH ótimo, estabilidade e localização celular e subcelular (lisossomal, endossomal e intramembrana) (Dunn BM, 2002; Benes P, Vetvicka V, Fusek M, 2008).

1.1.2. Peptidases Aspárticas e Importância Biológica

As peptidases aspárticas humanas, por muito tempo, têm sido alvo de pesquisas médicas e farmacêuticas pela sua ocorrência em muitos tecidos, fluidos biológicos e seu envolvimento em várias doenças, como hipertensão (Schales O, 1942), maturação do vírus da imunodeficiência humana (Kay J, Dunn BM, 1990), doença de Alzheimer (Mori H et al., 1992), formação de úlceras gástricas (Tanaka Y et al., 1991), neoplasias (Capony F et al., 1989; Spyrtos F et al., 1989; Thorpe SM et al., 1989; Tandon AK et al., 1990) e liberação de peptídeos biologicamente ativos (Hial V, Keiser HR e Pisano JJ, 1976; Gomes RAS et al., 1996 e 1997).

A atividade de catepsina D no soro é um marcador da atividade normal de remodelação e fagocitose endógena tecidual e aumenta em pacientes após infarto agudo do miocárdio, apresentando uma relação inversa com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Yamac

AH et al., 2015). Devido à propriedade de clivar fibronectina e laminina é considerada um biomarcador para câncer de mama (Abbott DE et al., 2010). A catepsina E tem sido relacionada na via de processamento das moléculas do MHC classe II (Igarashi S et al., 2004).

A expressão de aspartil proteases na placenta humana sugere algum papel no processo de implantação (Majewska M et al., 2017). Aspartil peptidases intramembrana clivam substratos nos limites da bicamada lipídica e os produtos são peptídeos e proteínas envolvidos em vários processos bioquímicos, tais como metabolismo celular, diferenciação, desenvolvimento, resposta imune e sentinela (Brown MS et al., 2000) e são utilizadas como alvos para drogas para um número de doenças (Verhelst SHL, 2017).

A presença de cininogenases ácidas foram descritas no tecido vascular com atividade de catepsina D na aorta e no ventrículo esquerdo em cães (Moshi MJ et al., 1992). Uma aspartil peptidase também foi caracterizada com uma atividade cininogenásica (Gomes RAS et al., 1997). A pepsina, uma outra importante aspartil peptidase, foi associada a liberação de cinina (Met-Lys-Bradykinin-Ser) pela clivagem do cininogenio (Gomes RAS et al., 1996). As cininas são peptídeos de baixo peso molecular que participam dos processos inflamatórios devido a sua capacidade de ativar células endoteliais e, como consequência, provocar vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, produção de óxido nítrico e mobilização do ácido araquidônico. As cininas também estimulam terminações nervosas sensoriais e os parâmetros inflamatórios como rubor, calor, edema e dor, podem resultar do processo de formação de cininas (Kaplan AP et al., 2002).

1.1.3. O Fluido Pericárdico

O fluido pericárdico contido na cavidade pericárdica é um fluido seroso, complexo e dinâmico, secretado pelas células mesoteliais que estão em contato com o coração e cuja composição reflete seu status fisiológico. O pericárdio e o líquido pericárdico nele contido servem para lubrificar as superfícies do coração, mantendo sua posição geométrica fixa e fazendo seu isolamento das outras estruturas do tórax, prevenindo aderências e propagação de infecções, bem como, a dilatação das câmaras cardíacas (Shabetai R, 1999).

Além deste papel mecânico, foi observado que durante os processos patológicos cardíacos os níveis de fatores bioquímicos no fluido pericárdico são significativamente alterados, incluindo hormônios, neurotransmissores, citocinas, fatores de crescimento e de apoptose. O conteúdo molecular e celular do líquido pericárdico têm se mostrado um ótimo material para pesquisas cardiovasculares (Xiang F et al., 2013).

Estudos clínicos em pacientes com doenças cardíacas mostraram que algumas substâncias relacionadas com fisiopatologia do coração estão em maior concentração no líquido pericárdico que no plasma. Na isquemia miocárdica fatores angiogênicos se acumulam no fluido pericárdico, sugerindo uma contribuição para a angiogênese pós-isquêmica. Enzimas cardíacas e troponinas em concentrações maiores no fluido pericárdico do que no plasma foram observadas no exame *post-mortem* de indivíduos acometidos por infarto agudo do miocárdio (Pérez-Cárceles MD et al., 2004; Osuna E et al., 1998), assim como fatores biologicamente ativos como os peptídeos natriuréticos atrial e cerebral, e endotelina-1 em pacientes com insuficiência cardíaca (Szokodi I et al., 1998; Watanabe M et al., 2009).

Várias enzimas já tiveram suas atividades detectadas e caracterizadas no líquido pericárdico. A catepsina D é liberada para o espaço intersticial durante a isquemia do miocárdio (Araki H, Takenaka F, 1975). Uma enzima conversora de angiotensina foi isolada e caracterizada do fluido pericárdico humano, bem como, foi observada que a atividade enzimática era maior no fluido pericárdico humano do que no plasma de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, sugerindo uma origem local para a enzima (Gomes RAS et al., 2008). Experimentos utilizando pericárdio bovino demonstraram que uma enzima conversora de angiotensina é produzida pelas células mesoteliais do pericárdio parietal (Vieira ML et al., 2008; Filho IRS et al., 2017).

A atividade de aspartil peptidase no fluido pericárdico humano foi evidenciada em estudo anterior, suscetível à inibição pela pepstatina A e com atividade cininogênica (Del Ciello G et al, 2015). Esses dados mostram que o pericárdio não é apenas uma membrana para conter um fluido lubrificante e que a composição do fluido pericárdico além de ser indicador de processos que acontecem no miocárdio através da transudação de moléculas, ainda apresenta síntese local de fatores com ação parácrina para o próprio miocardiócito.

1.1.4. A Calistatina

A calistatina, é uma proteína de ligação à calicreína tecidual (Chao J, Chai KX, Chao L, 1996) e foi identificada como um membro da superfamília das serpinas (*serine protease inhibitors*) que exercem importantes papéis na manutenção de vários sistemas fisiologicamente importantes. O controle destes sistemas, como nas cascatas proteolíticas, na coagulação sanguínea e na proteção das células do sistema imune de suas próprias proteases citotóxicas, é finamente balanceado. É uma família de proteínas de alto peso molecular, largamente

distribuídas com propriedades de inibidores de serino e cisteíno proteases. A característica que define uma serpina é uma estrutura primária com cerca de 380 resíduos de aminoácidos que se dobra em um único domínio composto de 3 folhas β e 8 ou mais α -hélices organizadas de um lado da principal folha β (folha A). Uma estrutura é crítica para a molécula funcionar como inibidor de protease: uma alça exposta, denominada alça do centro reativo (RCL – Reactive center loop). As serpinas plasmáticas englobam proteínas como a antitrombina, Inibidor C1, Inibidor do ativador do plasminogênio, Alfa-1 anti-tripsina (α 1– AT), principal inibidor da elastase de neutrófilos e a calistatina (Pike RN et al., 2002).

A composição do sítio reativo da calistatina humana é único entre todas as serpinas e ideal para a ligação com a calicreína tecidual. Os resíduos P2-P1-P1' da calistatina foram identificados como Phe-Phe-Ser. Substituições de aminoácidos nas posições P2 e P1 através de mutagênese sítio-dirigida mostraram que a Phe (P1) é essencial, pois cria um ambiente hidrofóbico para a interação da calicreína com a calistatina (Zhou GX, Chao L, Chao J, 1992).

As aspartil proteases acomodam nos subsítios S_1 e S_1' substratos com cadeias mais estendidas e cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (Powers JC, Harley AD, Myers DV, 1977), modelo frequentemente utilizado na proposta de síntese de substratos específicos para essa classe de enzimas (Dunn BM et al., 1995). A sequência Lys-Pro-Ala-Lys-Phe-*Nph-Arg-Leu (P5 P4 P3 P2 P1 *P1' P2' P3'), onde * sinaliza o ponto de hidrólise, se mostrou bastante adequada como substrato para a atividade da pepsina porcina (Pohl J e Dunn BM, 1988). Ensaio utilizando essa sequência como base, mostraram que variações de resíduos nas posições P2 e P3 afetaram a catálise pela catepsina D, não acomodando um resíduo positivamente carregado na posição P2 (Scarborough PE et al., 1993).

Os peptídeos com apagamento intramolecular de fluorescência derivados do sítio reativo da calistatina foram utilizados na determinação da especificidade da catepsina D hepática humana e se mostraram altamente suscetíveis à hidrólise na ligação Phe-Phe, apesar de apresentar Lys e Ser nas posições P2 e P2' (Pimenta DC et al., 2001). Ensaio utilizando catepsina D isolada de baço, gastricsina, pepsina e uropepsina humanas, para a hidrólise dos peptídeos Abz-AIKFFSRQ-Eddnp, Abz-AIAFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp e Abz-AISFFSRQ-Eddnp, da série usada por Pimenta DC et al., 2001, mostraram clivagem na ligação Phe-Phe, e que o resíduo Leu na posição P2 foi a substituição que mais afetou a atividade catalítica para as quatro enzimas testadas. Para a gastricsina, pepsina e uropepsina a melhor atividade catalítica observada foi aquela com Lys em P2. A catepsina D de baço apresentou melhor atividade catalítica com Ala em P2 (Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009).

Esses dados sugerem que a cadeia lateral ramificada interfere na interação na posição P2 mais significativamente do que o volume da cadeia lateral, considerando o grupamento ϵ -amino do resíduo Lys em P2 (Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009).

Uma aspartil peptidase suscetível à inibição pela pepstatina A, foi purificada a partir do fluido pericárdico humano e apresentava atividade cininogenásica em meio ácido (Del Ciello G et al., 2015). A caracterização das propriedades catalíticas da aspartil peptidase do fluido pericárdico frente as mudanças de resíduos de aminoácidos que flanqueiam o ponto de clivagem, poderá trazer informações importantes sobre o comportamento dessa enzima quanto às interações em seu sítio ativo. De posse dos substratos peptídicos Abz-AIKFFSRQ-Eddnp, Abz-AIAFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp e Abz-AISFFSRQ-Eddnp, será possível fazer uma avaliação da influência das alterações na posição P2 na atividade da enzima. Ainda será importante a caracterização dessa atividade enzimática sobre a sequência do centro reativo da calistatina, visto que o controle da atividade deste inibidor envolve a atividade da calicreína, conhecida por liberar cininas, envolvidas no controle do tônus vascular e no processamento de vários hormônios peptídicos presentes no fluido pericárdico (Lawrence MG, Lai J, Clements JA, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar das aspartil peptidases apresentarem um sítio ativo bastante conservado, são enzimas que apresentam preferências bem distintas no que se refere às interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico. Essas diferenças são importantes do ponto de vista biológico, porque em cada tecido/célula há condições e necessidades metabólicas próprias, de acordo com os componentes químicos/bioquímicos disponíveis no meio, tais como substratos, cofatores, inibidores e produtos. Neste contexto, a busca para a compreensão do comportamento de enzimas que apresentam especificidades catalíticas próprias, a depender do local onde atuam e de diferenças na sua estrutura pode mostrar a existência de isoenzimas.

A atividade das aspartil peptidases no fluido pericárdico, já descrita por vários pesquisadores, envolve principalmente, seus efeitos deletérios no tecido cardíaco após episódios de isquemia. Entretanto, independente da ocorrência de processos isquêmicos e consequente necrose tecidual, essa classe enzimática está presente nesse fluido e tem capacidade de gerar e hidrolisar peptídeos vasoativos a partir de uma série de substratos presentes nos tecidos e fluidos biológicos, demonstrando assim seu efeito parácrino. Como endopeptidases, as aspartil proteases hidrolisam, preferencialmente, ligações entre resíduos hidrofóbicos. No entanto, além da presença desses resíduos é interessante a influência de

aminoácidos contíguos ao ponto de hidrólise nos substratos. Estas observações trazem informações importantes sobre a interação enzima-substrato no sítio ativo, que podem subsidiar a construção de inibidores mais específicos para os membros da classe das aspartil peptidases, provenientes de tecidos e fluido biológicos distintos.

3. HIPÓTESE

Dados da literatura e aqueles obtidos em experimentos já realizados em nosso laboratório demonstram que as aspartil peptidases representam uma classe enzimática que pode estar envolvida em vários processos tanto fisiológicos como fisiopatológicos.

Nossa proposta é que a(s) aspartil peptidase(s) do fluido pericárdico apresentem um comportamento cinético mais parecido com as enzimas de parênquima, distinto das enzimas de natureza secretória como pepsina, gastricsina e com características mais próximas àquelas da catepsina D.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Caracterizar a atividade hidrolítica de uma aspartil peptidase isolada do fluido pericárdico humano.

4.2. Objetivos específicos

- a. Determinar as constantes catalíticas (K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M) para a enzima utilizando peptídeos sintéticos fluorogênicos contendo sequências em torno do sítio reativo da calistatina; Abz-AIKFFSRQ-Eddnp, Abz-AIAFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp e Abz-AISFFSRQ-Eddnp.
- b. Verificar a influência da substituição de resíduos de aminoácidos na posição P2 dos substratos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção do fluido pericárdico

O fluido pericárdico humano foi obtido junto à necropsia de cadáveres sem alterações cardiovasculares no Serviço de Verificação de Óbito do Hospital de Clínicas da UFTM. Projeto aprovado pelo CEP-FMTM (Protocolo CEP/FMTM – 0022, aprovado em 24/03/2000).

5.2. Obtenção da enzima purificada

A enzima foi isolada a partir de fluido pericárdico humano, dialisado contra água destilada, liofilizado e mantido a -20°C . As etapas de purificação incluíram:

5.2.1. Dosagem de proteínas (Lowry et al., 1951)

Foi preparado uma solução de trabalho, misturando os reagentes abaixo nas seguintes proporções:

Na_2CO_3 a 2% em NaOH 0,5 N.....	14,7 mL
Tartarato de sódio e potássio a 2%.....	0,15 mL
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,64%.....	0,15 mL

Para determinação da concentração de proteínas, foi misturado 0,1 mL da amostra ou padrões com 1,0 mL da solução de trabalho, após a homogeneização e repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado à mistura 0,4 mL do reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção de 1:1 com água destilada preparada no momento do uso. A mistura foi agitada cuidadosamente e deixada em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram realizadas leituras de absorbância a 650 nm e as concentrações determinadas utilizando uma curva padrão de soroalbumina bovina obtida nas mesmas condições do ensaio.

Curva padrão para soroalbumina bovina:

Tabela 1. Parâmetros para construção da curva a partir da solução de soroalbumina bovina 0,1 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%):

Tubos	Concentração (µg)	Padrão (µL)	NaCl 0,9% (µL)
1	5	50	950
2	10	100	900
3	20	200	800
4	40	400	600
5	50	500	500
6	70	700	300
7	80	800	200
8	100	1.000	0

5.2.2. Cromatografia em coluna de resina Cibacron Blue Agarose® (Bio-Rad)

A coluna com dimensões de 12 cm de altura x 3,0 cm de diâmetro foi equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. O fluido pericárdico humano liofilizado (3,2 g) foi reconstituído em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Alíquotas de 3,0 mL (contendo 54 mg de albumina) foram aplicadas à coluna em resina Cibacron blue agarose® (Bio-Rad). Após a aplicação na coluna, a atividade enzimática foi testada antes e após a centrifugação sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0. Os pools contendo um volume total de 650 mL, foram centrifugados a 10.000 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação, se obteve um volume aproximado de 600 mL. Neste volume, foram realizados testes de atividade enzimática sendo que, para cada teste foi utilizado 100 µL destes volumes como amostra. A cada etapa de purificação procedeu-se à análise do grau de pureza e avaliação da massa molecular aparente através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições redutoras e não-redutoras. O substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, sequência clássica e suscetível à hidrólise por aspartil proteases (Pohl J e Dunn BM, 1988), foi utilizado nas etapas subsequentes de purificação.

5.2.3. Cromatografia em coluna de resina Q-Sepharose® (Pharmacia)

À coluna contendo resina Q-Sepharose® (Pharmacia) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, foi aplicado o efluente centrifugado da coluna de Cibacron blue agarose® (Bio-Rad). Frações de 8,0 ml foram coletadas, a absorvância em 280 nm foi determinada até que as leituras atingissem valor igual àquela do tampão de equilíbrio da coluna. A seguir foi feito um gradiente utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e contendo concentrações crescentes de NaCl (0,2 a 1,0 M). Frações de 3,0 mL de volume foram coletadas. Todas as frações foram testadas para atividade enzimática sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas, concentradas em tubos de centrifugação (Vivaspin® Turbo 15 RC), centrifugadas a 5.000 rpm, 4°C (3.900 g), por 30 minutos.

5.2.4. Cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia)

A amostra contendo atividade enzimática foi aplicada em alíquotas de 0,5 mL em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia) com dimensões de 30 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro. Foi utilizado um fluxo de 0,4 mL por minuto. A coluna foi equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, contendo NaCl 1,0 M para estimar a massa molecular. Frações de 2,0 mL foram coletadas e a absorvância determinada em 280 nm. Todas as frações foram testadas para atividade enzimática sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Padrões de massa molecular gama globulina bovina (150 kDa), soroalbumina bovina (65 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C (12,4 kDa) foram utilizados para construção da curva para estimativa da massa molecular. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e concentradas em tubos de centrifugação (Vivaspin® Turbo 15 RC), centrifugadas a 5.000 rpm, 4°C (3.900 g), por 30 minutos. O material concentrado foi utilizado para as etapas de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e cinética enzimática.

5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) (Laemmli UK, 1970)

As etapas de purificação foram acompanhadas de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 13% das frações contendo atividade de aspartil peptidase. As amostras foram diluídas em tampão de amostra, colocadas em banho maria em ebulição por 5 minutos, centrifugadas (5.000 rpm) por 2 minutos e aplicadas às canaletas. Como padrão de massa molecular foi usada a soroalbumina bovina (65 kDa) submetida às mesmas condições da amostra e colocada em uma canaleta separada. A corrida eletroforética foi feita em voltagem constante 120V utilizando fonte Bio-Rad (modelo 1000/500). Os géis foram corados pela prata amoniacal (Tunón P, Johanson KE, 1984). A amostra foi aplicada em condições redutoras com β -mercaptoetanol e não redutoras. A cada etapa de purificação procedeu-se à análise do grau de pureza e avaliação da massa molecular aparente através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS).

Solução de acrilamida:

Acrilamida (Merck).....30,0 g
 Bis-acrilamida (Sigma).....0,80 g
 Água deionizada q.s.p.....100 mL

Solução de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) a 2% em água deionizada.

Solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em água deionizada.

Solução de persulfato de amônio (PSA, Sigma) a 10% em água deionizada, preparada no momento do uso.

N-N-N-N-tetrametiletenodiamina (TEMED) (Bio-Rad)

Usado puro na quantidade de 10,0 μ L.

5.4. Preparo dos géis

Gel de separação (13%)

Solução de acrilamida.....13,0 mL

Tampão tris-HCL (Merck) 0,9 M pH 8.8.....	13,0 mL
Água deionizada.....	2,0 mL
SDS 2% (Sigma).....	1,5 mL
TEMED (Bio-Rad).....	10 µL
Persulfato de amônio (Bio-Rad) 10%.....	0,15 mL

A mistura foi distribuída entre duas placas de vidro medindo 20 por 20 centímetros e 20 por 22 centímetros utilizando espaçadores com 1,0 milímetro de espessura.

Gel de concentração

Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de concentração:

Solução de acrilamida.....	1,75 mL
Tampão tris-HCL (Merck) 0,5 M pH 6.8.....	8,0 mL
Água deionizada.....	1,45 mL
SDS (Sigma) 10%.....	0,1 mL
TEMED (Bio-Rad)	10 µL
Persulfato de amônio (Bio-Rad) 10%.....	0,05 mL

Esta mistura foi colocada sobre o gel de separação e um pente para formação de 15 canaletas foi montado até a polimerização do gel. Após a polimerização o pente foi retirado e as canaletas formadas foram lavadas com água deionizada 3 vezes para retirar o excesso de acrilamida não polimerizada. O gel foi acoplado a um sistema de eletroforese vertical Protean® II xi, Bio-Rad e as amostras do fluido pericárdico contendo as peptidases aspárticas foram aplicadas em volumes que variaram de 20 a 100 µL. Após a aplicação das amostras o gel foi submetido à corrida eletroforética com voltagem constante de 120V utilizando Bio-Rad, modelo 1000/500.

5.5. Tampões utilizados

Tampão da amostra

Tampão tris-HCL (Merck) 2 M, pH 6.8.....	0,10 mL
--	---------

Azul de Bromofenol (Merck) 0,05% em água deionizada.....	0,12 mL
Glicerol 60% (Reagen).....	1,0 mL
β -Mercaptoetanol (Merck).....	0,3 mL
SDS (Sigma) 10%.....	0,6 mL

As amostras foram diluídas no tampão de amostra na proporção de 2:1 e colocadas em banho maria em ebulição durante 2 minutos. Quando a eletroforese era feita em condições não redutoras, suprimia-se o β -Mercaptoetanol do tampão acima.

Tampão de corrida

Tris-hidroximetilaminometano (Merck).....	3,02 g
Glicina (Reagen).....	14,4 g
SDS (Sigma).....	1,0 g
Água deionizada q.s.p.....	1.000 mL

5.6. Coloração dos géis pela prata amoniacal (Tunón P, Johanson KE, 1984)

Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e em seguida colocados em uma cuba de vidro contendo solução pré-fixadora 1 durante 4 horas, em temperatura ambiente. A seguir, a solução pré-fixadora 1 foi substituída pela solução pré-fixadora 2, na qual os géis permaneceram durante 1 hora. Após isto os géis foram lavados 3 vezes durante 15 minutos com água destilada e colocados durante 45 minutos em solução de glutaraldeído (Reagen) 25% diluído na proporção de 1:2 com água deionizada. Os géis foram lavados 3 vezes com água deionizada durante 15 minutos e após esta etapa adicionou-se uma solução de prata amoniacal na qual os géis foram mantidos durante 30 minutos em ambiente escuro. Em seguida os géis foram lavados 2 vezes durante 15 minutos por vez. Foi então adicionada solução reveladora sob agitação suave até que as bandas correspondentes às proteínas atingissem a coloração desejada. Neste momento, a solução reveladora foi substituída pela solução inativadora. Os géis foram mantidos nesta solução durante 2 horas e após este período a mesma foi substituída por uma solução de secagem. Após permanecerem durante 2 a 12 horas na solução de secagem os géis foram secos entre duas folhas de papel celofane sobre uma placa de vidro.

5.6.1. Soluções utilizadas na coloração

Pré-fixador 1

Metanol (Merck).....	500 mL
Ácido acético (Reagen).....	70 mL
Água deionizada.....	430 mL

Pré-fixador 2

Metanol (Merck).....	100 mL
Ácido acético (Reagen).....	100 mL
Água deionizada.....	800 mL

Solução de prata amoniacal

a) NAOH (Synth) 0,5 N.....	5,0 mL
NH ₄ OH (Reagen) 14,8 M.....	0,7 mL
Água deionizada.....	20 mL
b) Nitrato de prata (Merck).....	0,1 g
Água deionizada.....	20 mL

A solução (b) foi lentamente adicionada à solução (a). Caso ocorresse precipitação durante a adição da solução (b), adicionava-se hidróxido de amônia puro lentamente até o desaparecimento do precipitado. Este procedimento foi repetido até a adição de toda a solução (b).

Solução reveladora

Água deionizada.....	100 mL
Formaldeído 37% (Merck).....	0,1 mL
Ácido cítrico 2,3 M (Qeel).....	0,025 mL

Solução inativadora

Água deionizada.....	100 mL
Ácido acético (Reagen).....	1,0 mL

Solução de secagem do gel

Glicerol (Merck).....	1,0 mL
Ácido acético (Reagen).....	10 mL
Metanol (Merck).....	40 mL
Água deionizada q.s.p.....	100 mL

5.7. Estimativa da massa molecular aparente por cromatografia de filtração em gel em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia)

Para estimar a massa molecular aparente procedeu-se à cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia) juntamente com padrões de massas moleculares conhecidas. Após a cromatografia, foi feito o cálculo do coeficiente de partição (K_{av}) dos padrões e da amostra aplicando-se a fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

onde:

V_e = volume de eluição da amostra; V_o = volume vazio da coluna dado pelo volume de eluição do azul dextran; V_t = volume total da coluna.

Os valores encontrados foram registrados, sendo os valores do K_{av} colocados no eixo das abcissas e os valores de massa molecular dos padrões no eixo das ordenadas (escala logarítmica). A massa molecular aparente da proteína purificada foi estimada pela interpolação gráfica do valor K_{av} obtido.

5.8. Determinação das constantes catalíticas

5.8.1. Substratos Sintéticos

Os substratos utilizados foram Abz-Ala-Ile-Lys-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-Eddnp (Abz-AIKFFSRQ-Eddnp), Abz-Ala-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-Eddnp (Abz-AIAFFSRQ-Eddnp), Abz-Ala-Ile-Leu-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-Eddnp (Abz-AILFFSRQ) e Abz-Ala-Ile-Ser-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-Eddnp (Abz-AISFFSRQ-Eddnp), sendo o radical Abz o ácido orto-amino benzóico e o radical Eddnp o N-[2,4-dinitrofenol]-etilenodiamino. Os substratos foram sintetizados e gentilmente fornecidos pelo Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) pelos professores Luiz Juliano e Maria Aparecida Juliano. Foi preparada uma solução estoque (1,0 mg/mL) solubilizando os substratos em 20 μ L de dimetilformamida (Nuclear) e completando-se o volume com água Milli-Q (Millipore Simplicity).

5.8.2. Determinação do pH ótimo

A determinação do pH ótimo foi feita incubando-se a enzima purificada com os substratos em tampões com valores de pH que variaram de 4,0 a 8,0 com intervalos de 1,0 unidade de pH (4,0 e 5,0), acetato de sódio 0,2 M, Chemco; pH 6,0, fosfato monobásico de sódio 0,2 M, Synth; pH 7,0 e 8,0, tris-(hidróximetil)-aminometano 0,2 M, Nuclear). As incubações foram feitas em cubeta termostaticada e sob agitação contínua, na proporção de 1,89 mL de tampão, 100 μ L de cada substrato na concentração de 1 mg/mL e 10 μ L da enzima. As leituras de fluorescência foram feitas em espectrofluorômetro RF-5301PC (Shimadzu), durante 50 minutos, com registro a cada 10 minutos, empregando comprimento de onda de excitação de 320 nm e de emissão de 420 nm. A variação de fluorescência por minuto ($\Delta f/\text{minuto}$) foi convertida em μ M por litro por minuto ($\mu\text{M} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

5.8.3. Determinação dos pontos de clivagem

A determinação dos pontos de clivagem já foi realizada em um estudo anterior por Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009. As enzimas purificadas foram incubadas com os substratos sintéticos e os fragmentos liberados foram analisados em HPLC de fase reversa, em coluna octadecilsilano (C18) Lichrospher-Hibar 100 RP-18 (Merck) medindo 5,0 x 125 mm com partículas de 4,0 µm de diâmetro, conectada a um sistema de duas bombas injetoras modelo LC9A (Shimadzu). Alíquotas de 100 µL da mistura de incubação foram submetidas a um gradiente de acetonitrila (Merck) contendo ácido trifluoracético (Carlo Erba) em uma concentração final de 0,1%. Como solvente A foi utilizada acetonitrila a 20% em água deionizada e como solvente B, acetonitrila a 100%, sendo que o fluxo foi de 1,0 mL por minuto. A detecção dos produtos de hidrólise foi feita em 214 nm por um detector de luz UV/visível modelo SPD 6AV (Shimadzu), acoplado em série com um detector de fluorescência modelo RF535 (Shimadzu), utilizando comprimento de onda de excitação de 320 nm e de emissão 420 nm. O registro foi feito através de um registrador modelo CR4A Chromatopac (Shimadzu). Também foram feitas incubações dos substratos com as enzimas purificadas e com seu inibidor específico a Pepstatina A.

5.8.4. Análise de aminoácidos pelo método da pré-derivatização (Burbach JPH et al., 1982)

Foi realizada a análise dos aminoácidos dos fragmentos liberados da incubação das enzimas com os substratos fluorogênicos. Os fragmentos fluorescente e não fluorescente resultantes foram recolhidos em frascos separados, liofilizados, reconstituídos com água deionizada e colocados em ampolas. A cada ampola acrescentou-se 0,05 ml de ácido clorídrico/ácido propiônico (Sigma) (50:50) 4,0 N, as ampolas foram lacradas e colocadas em estufa a 110°C durante 24 horas para hidrólise. Em seguida as ampolas foram abertas e secas à vácuo. Depois de secas, adicionou-se 0,2 ml de tampão borato de sódio (Merck) 0,1 M pH 9,1. Os 4 reagentes utilizados na pré-derivatização dos aminoácidos foram: tampão borato (Merck) 0,1 M pH 9,1 com 10 µL de β-mercaptoetanol (Merck) (reagente 1) e tampão borato de sódio (Merck) 0,1 M pH 9,1 ao qual foram adicionados 5,0 mg de *o*-phtalaldeído (Merck)

previamente dissolvidos em 1,5 ml de etanol (Merck) (reagente 2). A coluna utilizada foi octadecilsilano (C18) Lichrocart-hibar 15542 medindo 4,0 x 125 mm com partículas de 4,0 μm de diâmetro (Merck) em sistema HPLC (Shimadzu). Foi feito gradiente utilizando como solvente A, citrato de sódio 0,1 M (Mallinckrodt), ácido bórico 0,1 M, pH 6,5, contendo metanol LiChrosolv® 20% e como tampão B, metanol 100%. Como padrão foi utilizado padrão de aminoácidos Sigma.

5.8.5. Determinação das constantes catalíticas K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para hidrólise de substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina

Os parâmetros K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M foram determinados para cada um dos substratos, utilizando tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 4,5 em cubeta termostatizada a 37° C, em espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu). A (λ_{Ex} 320 nm; λ_{Em} 420 nm). A variação de fluorescência por minuto ($\Delta f/\text{minuto}$) foi convertida em μM por litro por minuto ($\mu\text{M} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). A constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram deduzidas das velocidades de catálise medidas com diferentes concentrações de cada substrato. As velocidades da reação sobre concentrações crescentes de cada um destes substratos foram medidas através da formação do produto da ação enzimática, verificada por fluorimetria. Em seguida, foi feito um gráfico no qual os valores das concentrações crescentes de substrato [S] foram plotados no eixo X e os valores das velocidades de reação (μM de produto formado) foram plotados no eixo Y (gráfico de Michaelis-Menten). Foi feito também um gráfico de $1/[S]$ no eixo X e $1/V$ no eixo Y ou gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk, para facilitar a visualização dos parâmetros e determinação da K_M e de $V_{m\acute{a}x}$ por interpolação gráfica. As concentrações dos substratos foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar do etilenodiaminodinitrofenol Eddnp ($\epsilon_{365} = 17.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressas em micromolar (μM).

5.8.6. Titulação do sítio ativo com pepstatina A

A titulação do sítio ativo enzimático foi realizada com o inibidor da pepstatina A Isovaleril-Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA, Sigma, um hexapeptídeo semelhante ao estado de transição dos substratos normais (Morishima H et al., 1970). Foram feitas

incubações com o inibidor nas concentrações de $1,5 \times 10^{-7}$ mol/L a $7,4 \times 10^{-6}$ mol/L, utilizando uma concentração constante de $2,347 \mu\text{M}$ da enzima, sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp em tampão acetato de sódio $0,1 \text{ M}$, pH $4,5$ (q.s.p. $2,0$ de volume final). A atividade enzimática foi dada pela variação de fluorescência por unidade de tempo determinada para cada uma das concentrações do inibidor. Os resultados foram plotados e calculados no Origin Pro Enzyme Kinetics (OriginLab Technical Support), um programa específico para cinética enzimática.

6. RESULTADOS

6.1. Purificação

6.1.1. Obtenção do fluido pericárdico

O fluido pericárdico foi obtido à necropsia no Serviço de Verificação de Óbito do Hospital de Clínicas da UFTM, dialisado contra água destilada e liofilizado.

6.1.2. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry (Lowry et al.,1951). A concentração de proteínas no fluido pericárdico foi estimada em $5566,98 \mu\text{g/mL}$. Após aplicar a amostra do fluido pericárdico à coluna de resina Cibacron Blue Agarose® (Bio-Rad), a concentração de proteínas na amostra foi estimada $221,29 \mu\text{g/mL}$. Não foram realizadas novas dosagens de proteína após as cromatografias subsequentes, foram feitas correlações de acordo com as novas leituras em absorvância de 280 nm .

6.1.3. Cromatografia em coluna de resina Cibacron Blue Agarose® (Bio-Rad)

A cromatografia em coluna de resina Cibacron Blue Agarose® (Bio-Rad) foi utilizada para retirar a albumina da amostra. Nesta etapa, foram aplicadas alíquotas de 3,0 mL por fração e estimada a concentração de proteínas em 280 nm. A coluna foi equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e a sua atividade enzimática testada antes e após a centrifugação.

6.1.4. Cromatografia em coluna de resina Q-Sepharose® (Pharmacia)

Nesta etapa da purificação, foi aplicado o efluente centrifugado da coluna de Cibacron blue agarose® (Bio-Rad). A seguir foi feito um gradiente utilizando tampão fosfato de sódio contendo concentrações crescentes de NaCl. Alíquotas de 3,0 mL foram coletadas e testadas para atividade enzimática. A cromatografia realizada em concentrações crescentes de NaCl, mostra que a atividade enzimática foi eluída em uma concentração de 0,5 M de NaCl. No gráfico, o quadro delimitado pela linha pontilhada indica quais foram as frações utilizadas na etapa de cromatografia subsequente.

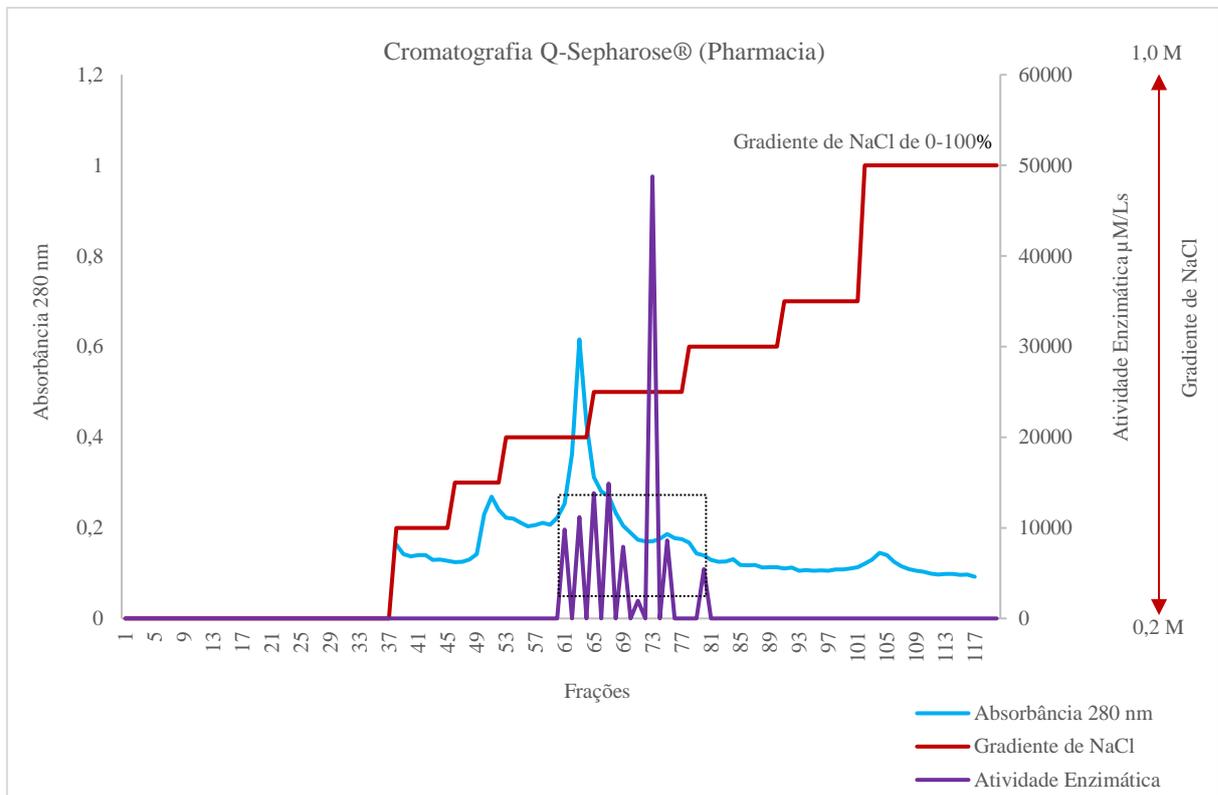


Figura 2. Cromatografia de coluna Q-Sepharose® (Pharmacia) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Foi feito um gradiente utilizando tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 6,0 contendo concentrações crescentes de NaCl (0,2 a 1,0M). Alíquotas de 3,0 mL foram coletadas e testadas para atividade enzimática sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0.

6.1.5. Cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia)

A amostra contendo atividade enzimática foi aplicada em alíquotas de 0,5 mL à coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia). Frações 3,0 mL foram coletadas e testadas para atividade enzimática. A massa molecular da enzima foi estimada através da cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia). As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e concentradas. O material concentrado foi utilizado nas etapas de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e cinética enzimática. No gráfico, o quadro delimitado pela linha pontilhada indica quais foram as frações que apresentaram atividade enzimática.

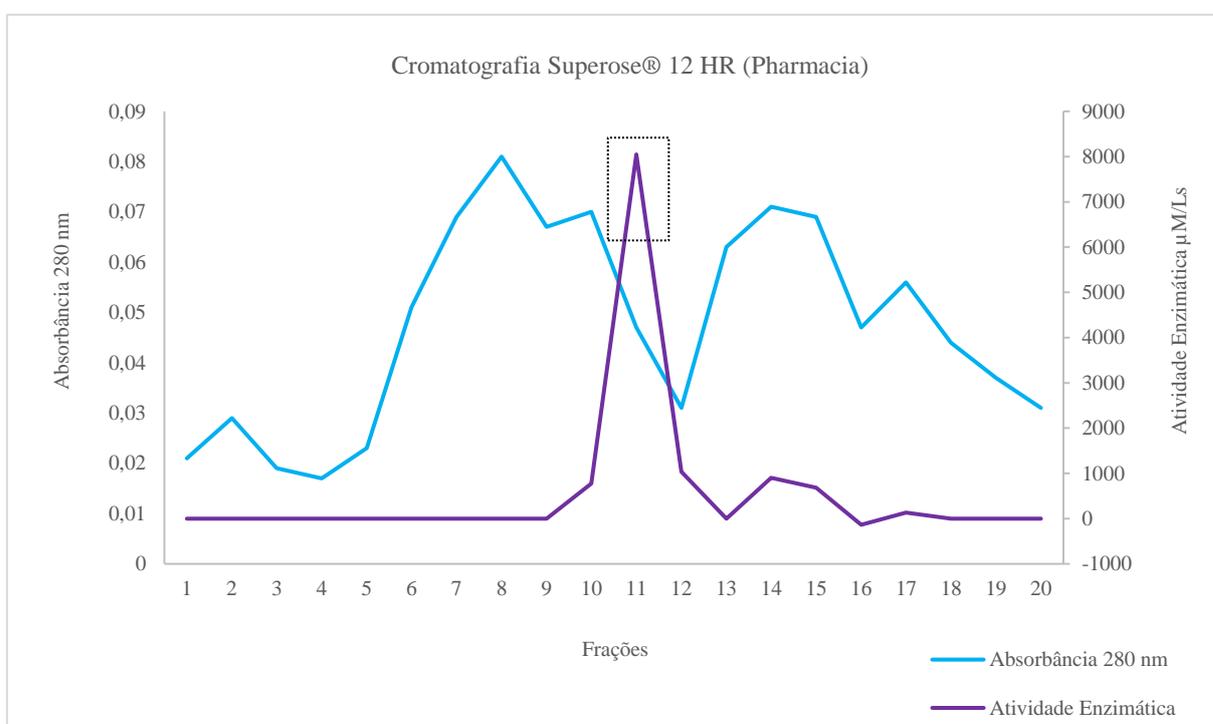


Figura 3. Cromatografia de coluna Superose® 12 HR (Pharmacia) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Foi feito um gradiente utilizando tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 6,0 contendo concentrações crescentes de NaCl (0,2 a 1,0M). Frações 3,0 mL foram coletadas e todas foram testadas para atividade enzimática sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0.

6.1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) (Laemmli UK, 1970)

A Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) mostra que a proteína isolada aparece como uma única banda com massa molecular superior à albumina bovina usada como padrão.



Figura 4. Eletroforese em gel poliacrilamida a 13% contendo SDS coradas pela prata amoniacal. Em 1 – Padrão de massa molecular 64 KDa (soroalbumina bovina), 2 e 3 – Amostra sem β -mercaptoetanol (condições não redutoras).

6.2. Características físico-químicas

6.2.1. Estimativa da massa molecular aparente por cromatografia de filtração em gel

Padrões de massa molecular conhecida foram utilizados para estimativa da massa molecular da aspartil peptidase do fluido pericárdico humano. A massa molecular da amostra foi estimada em 141 kDa.

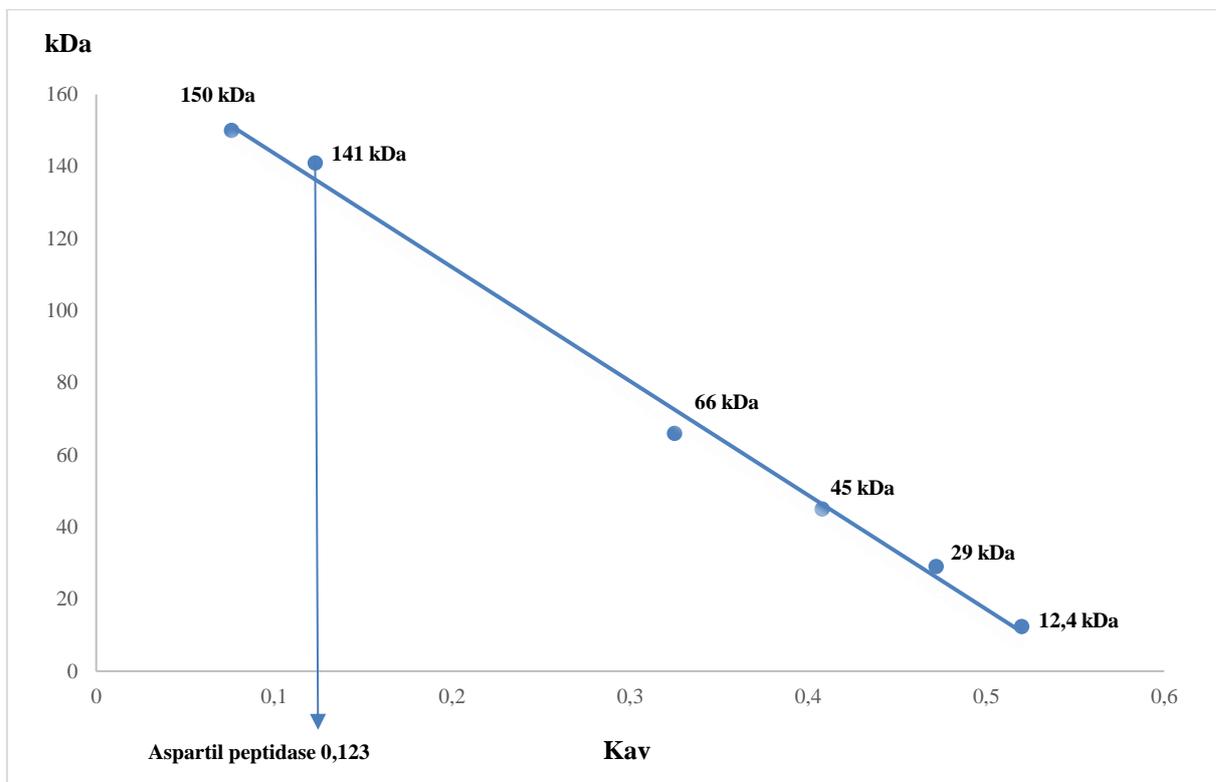


Figura 5. Estimativa da massa molecular da amostra contendo a aspartil peptidase do fluido pericárdico humano e padrões de massa molecular conhecida (gama globulina bovina 150 kDa, soroalbumina bovina 65 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 29 kDa e citocromo c 12,4 kDa).

6.2.2. Determinação do pH ótimo

O pH ótimo para a atividade da aspartil peptidase isolada neste estudo está entre pH 4 e 5.

6.2.3. Titulação do sítio ativo com pepstatina A

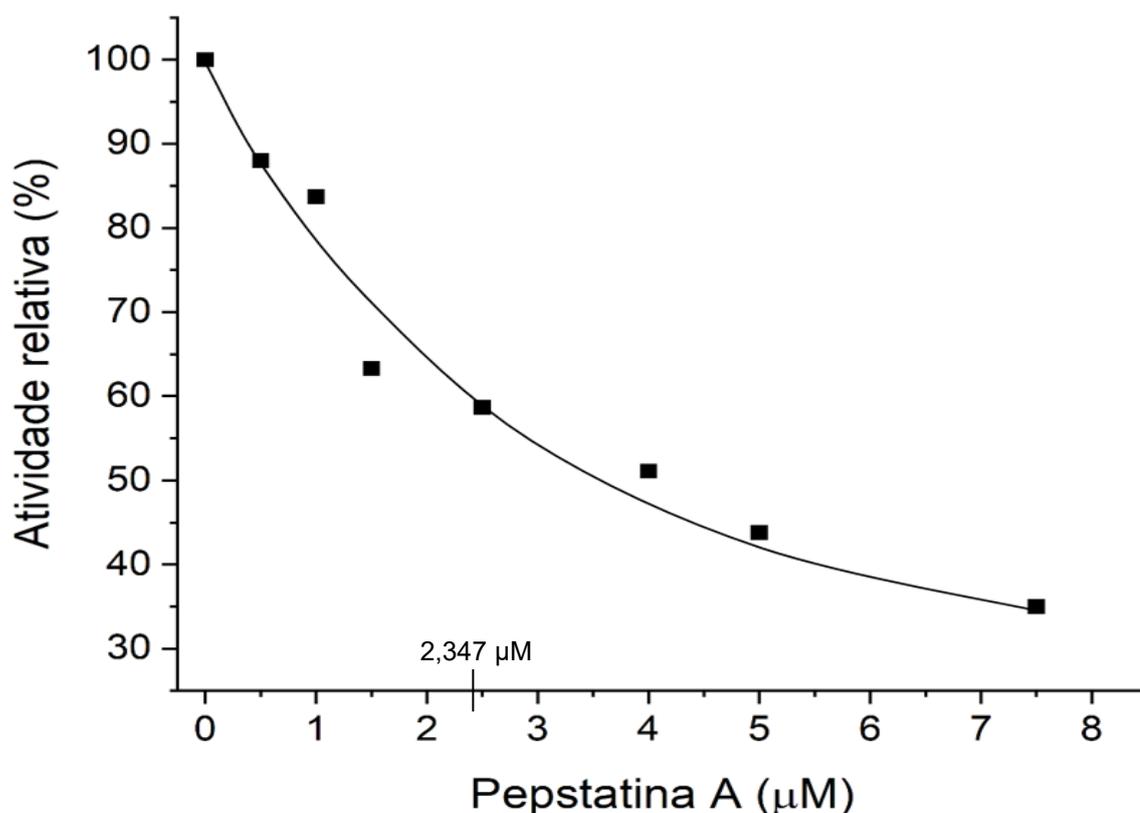


Figura 6. Titulação com pepstatina A para inibição da aspartil peptidase do fluido pericárdico humano. Foram feitas incubações com o inibidor nas concentrações de $1,5 \times 10^{-7}$ mol/L a $7,4 \times 10^{-6}$ mol/L, utilizando um volume constante da enzima e substrato em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,5. A atividade enzimática foi dada pela variação de fluorescência por unidade de tempo. A inibição foi feita utilizando um único substrato. Após a titulação do sítio ativo com pepstatina A, foi observado que a concentração da enzima ativa era de 2,347 μM.

6.3. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para a hidrólise dos substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina

Os parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M foram determinados para cada um dos substratos e demonstrados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para a hidrólise dos substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase isolada do fluido pericárdico humano.

Enzima	Sequência do Abz-peptídeo-Eddnp	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu M \times s^{-1}$)
Peptidase aspártica do fluido pericárdico	AIKFFSRQ	3,571	1,17	0,33
	AIAFFSRQ	0,981	5,45	5,56
	AILFFSRQ	1,755	6,18	3,52
	AISFFSRQ	1,053	4,34	4,12

A: Ala, alanina; F: Phe, fenilalanina; I: Ile, isoleucina; K: Lys, lisina; L: Leu, leucina; Q: Gln, glutamina; R: Arg, arginina; S: Ser, serina.

A enzima apresentou um perfil típico de velocidade *versus* a concentração de substrato frente às 4 (quatro) sequências de aminoácidos utilizadas.

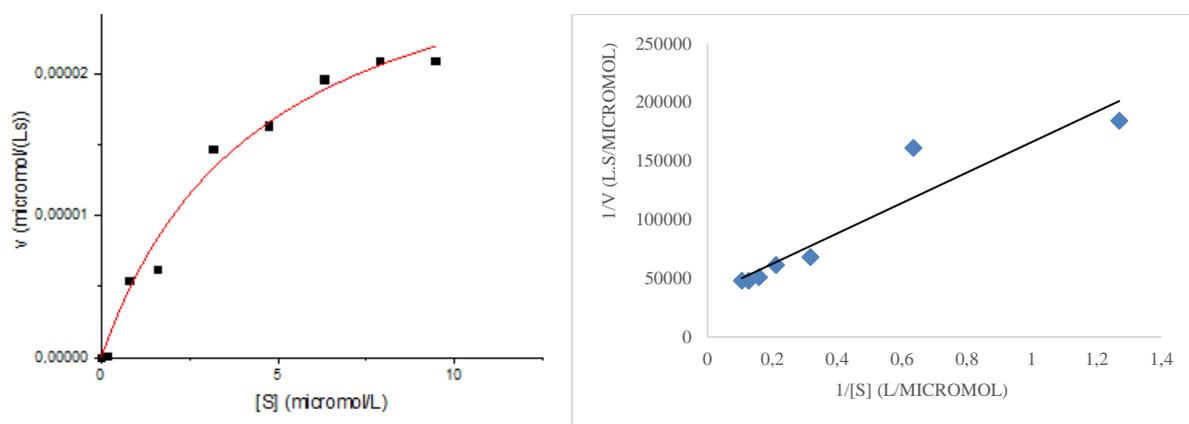


Figura 7. Hidrólise de Abz-AIKFFSRQ-Eddnp pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano em diferentes concentrações do substrato na presença de tampão acetato de sódio p.a 0,1 M, pH 4,5. Gráficos de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk. Concentração da enzima: 2,347 μM . Concentração do substrato: 2,78 μM em 100 μL .

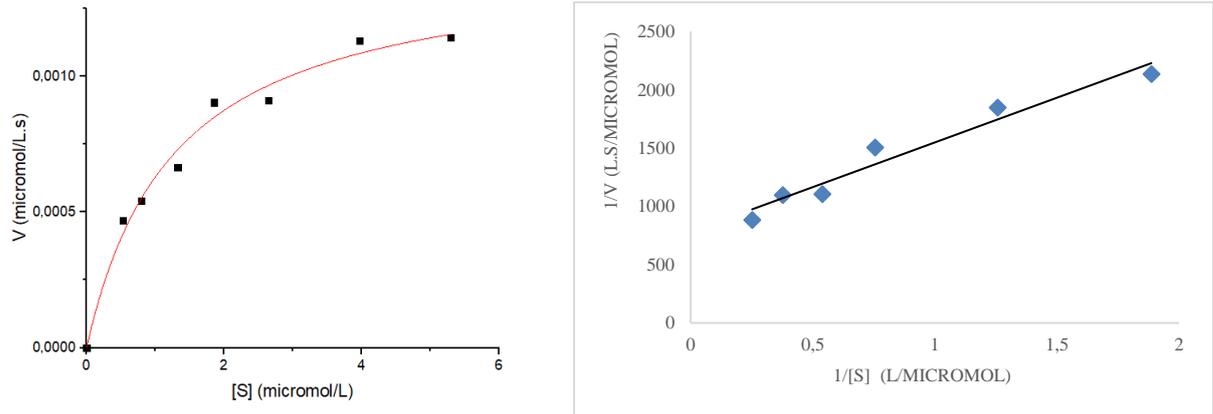


Figura 8. Hidrólise de Abz-AIAFFSRQ-Eddnp pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano em diferentes concentrações do substrato na presença de tampão acetato de sódio p.a 0,1 M, pH 4,5. Gráficos de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk. Concentração da enzima: 2,347 μ M. Concentração do substrato: 2,63 μ M em 100 μ L.

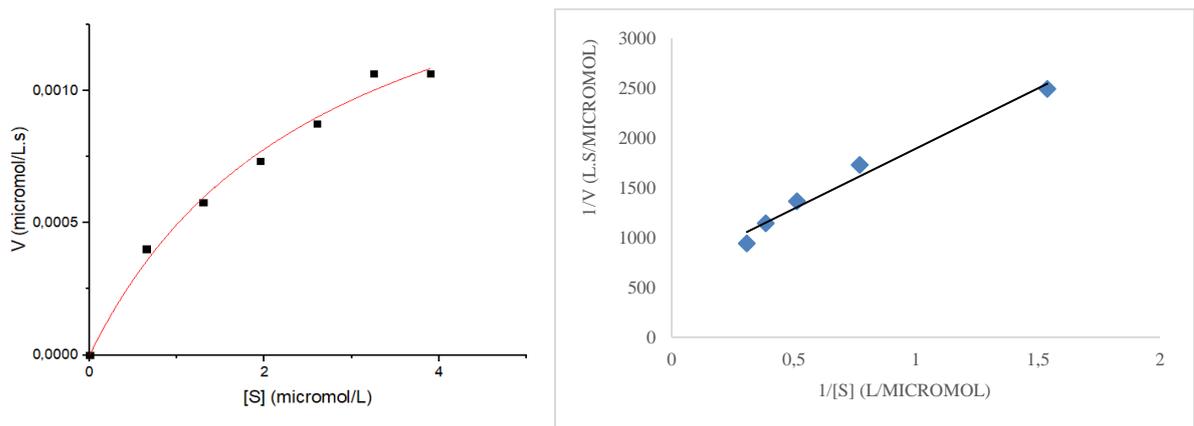


Figura 9. Hidrólise de Abz-AILFFSRQ-Eddnp pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano em diferentes concentrações do substrato na presença de tampão acetato de sódio p.a 0,1 M, pH 4,5. Gráficos de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk. Concentração da enzima: 2,347 μ M. Concentração do substrato: 1,45 μ M em 100 μ L.

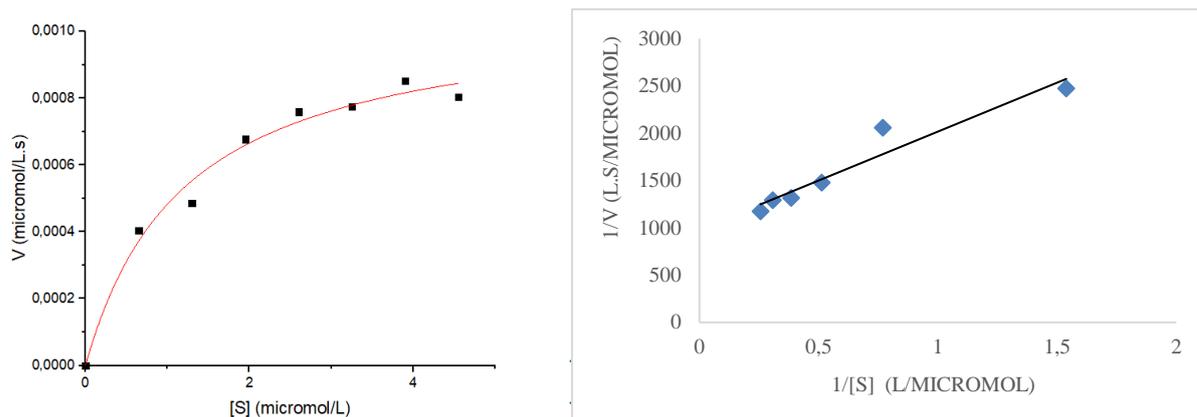


Figura 10. Hidrólise de Abz-AISFFSRQ-Eddnp pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano em diferentes concentrações do substrato na presença de tampão acetato de sódio p.a 0,1 M, pH 4,5. Gráficos de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk. Concentração da enzima: 2,347 μM . Concentração do substrato: 1,28 μM em 100 μL .

Os dados aqui apresentados foram utilizados para um estudo comparativo com dados observados para outras aspartil peptidases humanas utilizando o mesmo conjunto de substratos obtidos nas mesmas condições de ensaio demonstrados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para a hidrólise dos substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase isolada do fluido pericárdico humano e de peptidases aspárticas humanas isoladas de outras fontes.

Enzima	Sequência do Abz-peptídeo-Eddnp	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$)
Peptidase aspártica do fluido pericárdico	AIKFFSRQ	3,571	1,17	0,33
	AIAFFSRQ	0,981	5,45	5,56
	AILFFSRQ	1,755	6,18	3,52
	AISFFSRQ	1,053	4,34	4,12
Catapsina D (Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009).	AIKFFSRQ	0,600	4,36	7,27
	AIAFFSRQ	0,487	5,05	10,37
	AILFFSRQ	1,180	3,04	2,58
	AISFFSRQ	1,070	8,32	7,77

Gastricsina (Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009).	AIKFFSRQ	0,650	12,72	19,57
	AIAFFSRQ	0,568	5,89	13,38
	AILFFSRQ	0,700	1,62	5,37
	AISFFSRQ	0,648	6,33	8,76
Pepsina (Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009).	AIKFFSRQ	0,986	12,82	13,00
	AIAFFSRQ	0,698	5,89	8,44
	AILFFSRQ	0,540	1,62	3,00
	AISFFSRQ	1,220	6,33	5,19
Uropepsina (Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009).	AIKFFSRQ	0,717	4,77	6,65
	AIAFFSRQ	0,597	3,18	5,33
	AILFFSRQ	0,730	1,97	2,70
	AISFFSRQ	0,575	2,58	4,49
Catepsina D (Pimenta DC et al., 2001)	AIKFFSRQ	1,20	4,88	4,07
	AIAFFSRQ	0,27	16,25	60,18
	AILFFSRQ	0,19	7,80	41,05
	AISFFSRQ	0,32	8,78	27,43

A: Ala, alanina; F: Phe, fenilalanina; I: Ile, isoleucina; K: Lys, lisina; L: Leu, leucina; Q: Gln, glutamina; R: Arg, arginina; S: Ser, serina.

7. DISCUSSÃO

Este trabalho mostra que o fluido pericárdico humano contém atividade de aspartil peptidase, inibida por pepstatina A, que foi isolada após etapas de purificação por cromatografias em resina de Cibacron Blue Agarose® para retirar a albumina (presente em grande quantidade nesse fluido), troca iônica em resina Q-Sepharose® e filtração molecular em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia). A enzima isolada apresentou uma massa molecular aparente de 141 kDa. A atividade de aspartil peptidase foi observada apenas nessa região de massa molecular. Quando analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições não-redutoras foi observado uma banda proteica com massa molecular

aparente bastante superior a 65 kDa (padrão usado no procedimento) corroborando o dado obtido pela filtração molecular. Foi pressuposto que nessa condição cromatográfica a proteína se encontrava na forma nativa globular, visto que a atividade enzimática estava presente na amostra eluída.

O tratamento da enzima do fluido pericárdico com β -mercaptoetanol fez com que a banda proteica não pudesse mais ser visualizada na mesma região de massa molecular, sugerindo que a proteína nativa poderia estar na forma de dímero, ou ainda ligada a algum carreador presente no fluido pericárdico, o que necessita de mais experimentos para averiguação dessa possibilidade.

A aspartil peptidase presente no fluido pericárdico humano foi detectada e monitorada por meio de um protocolo de purificação pela hidrólise do substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, sequência clássica suscetível à hidrólise por aspartil peptidases (Dunn BM et al, 1995). Sabemos que a hidrólise ocorre entre as ligações Phe-Phe, em pH ácido (Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009). Substratos baseados na sequência do sítio reativo da calistatina usados em estudos de especificidade da catepsina D, foram hidrolisados na ligação Phe-Phe também, apesar da presença de Lys e Ser nas posições P₂ e P₂' da sequência do sítio reativo da calistatina desfavorecerem a ação enzimática da catepsina D (Scarborough PE et al., 1993). Pimenta DC et al., 2000 também observaram a hidrólise de substratos com apagamento intramolecular de fluorescência contendo Lys e Ser nas posições P₂ e P₂' na sequência do sítio reativo da calistatina.

A aspartil peptidase presente no fluido pericárdico humano, isolada neste trabalho foi avaliada quanto às propriedades catalíticas utilizando substratos com modificações na posição P₂ em torno do sítio reativo da calistatina (Abz-AIKFFSRQ-Eddnp, Abz-AIAFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp). Foi observado que à semelhança de outras aspartil peptidases a enzima do fluido pericárdico hidrolisou a ligação entre os resíduos de fenilalanina em todos os substratos utilizados (dados não mostrados). Esse comportamento permitiu comparar as propriedades catalíticas desta aspartil peptidase quando apenas o resíduo na posição P₂ é substituído.

Foi observado que a presença do resíduo Lys na posição P₂ foi a modificação que mais interferiu na capacidade catalítica da enzima k_{cat}/K_M , se comparado aos resíduos Leu, Ala e Ser nesta posição. A presença de um aminoácido carregado em P₂ (Tabela 2) reduziu tanto a afinidade da enzima pelo substrato (K_M) quanto a constante catalítica (k_{cat}). Estes dados são similares àqueles observados por Pimenta DC et al., 2001, que utilizando os mesmos substratos usados neste estudo e catepsina D de fígado humano, mostraram que Lys na posição P₂ foi a

modificação mais crítica para a hidrólise pela catepsina D, onde tanto a afinidade pelo substrato (K_M), quanto a constante catalítica (k_{cat}) contribuíram para a menor eficiência catalítica (Tabela 3).

Entretanto, estudos de Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009 com este mesmo grupo de substratos (Abz-AIKFFSRQ-Eddnp, Abz-AIAFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp), com pepsina, gastricsina, uropepsina e catepsina D de baço humanas mostraram que a substituição pelo resíduo Leu na posição P₂ foi a modificação que mais interferiu na capacidade hidrolítica, apesar deste grupo reunir enzimas secretórias e parenquimatosas. Contrariamente ao observado para a enzima do fluido pericárdico e por Pimenta DC et al, 2001, a catepsina D de baço usada por Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009, mostrou que Lys, Ala ou Ser em P₂ não são modificações críticas para a atividade catalítica. Vale ressaltar que foram utilizadas as mesmas condições para hidrólise do trabalho realizado por Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009.

Neste contexto, se pode inferir que a isoforma pericárdica de aspartil peptidase apresenta maior semelhança com a catepsina D hepática usada por Pimenta DC et al., 2001 que a isoforma isolada e caracterizada de baço por Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL, 2009. Estes dados são importantes por mostrar que as aspartil peptidases, nas suas isoformas, apesar de tantas similaridades estruturais, apresentam comportamentos distintos em relação às suas propriedades hidrolíticas. Estudos estruturais, como modelagem molecular da enzima frente aos substratos usados serão de grande valia no que se refere às interações no sítio ativo dessa isoforma.

Ainda não há referências à presença de calistatina ou de um possível papel na inibição da calicreína no fluido pericárdico, mas dados anteriores para o fluido pericárdico humano (Del Ciello G et al., 2015) já haviam mostrado a existência de uma atividade de serino peptidase relacionada à hidrólise de sequências sintéticas do cininogênio com características similares às calicreínas.

Dados obtidos por Wang Y et al., 2021, mostram que a KLK11 promove a hipertrofia de cardiomiócitos por ativação de AKT-mTOR sinalizando para a promoção da síntese proteica e que a repressão de mTOR bloqueia os papéis de KLK11 na regulação da hipertrofia do cardiomiócito.

Concluindo, se pode inferir que como o fluido pericárdico é um ultrafiltrado do plasma a partir do miocárdio, é pouco provável que a isoforma de aspartil peptidase aqui isolada a partir desse fluido tenha uma origem plasmática, visto que o processo de difusão é limitado a moléculas com massa moleculares inferiores a 40 kDa.

A hidrólise da calistatina pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano sugere um potencial papel parácrino da enzima no equilíbrio da relação calicreína-calistatina no espaço pericárdico.

8. CONCLUSÕES

- Uma peptidase que atua em pH ácido presente no fluido pericárdico humano foi purificada através das etapas cromatográficas de troca iônica e filtração molecular. A enzima foi inibida por pepstatina A, confirmando ser uma aspartil peptidase.
- A massa molecular aparente da enzima foi estimada em 141 kDa, por cromatografia de filtração em gel.
- A hidrólise de substratos com modificações na posição P2 em torno do sítio reativo da calistatina mostrou que a presença do resíduo Lys em P₂ foi a modificação mais deletéria para a atividade enzimática, tanto para a afinidade da enzima pelo substrato (K_M) quanto para a constante catalítica (k_{cat}).
- A isoforma pericárdica de aspartil peptidase apresenta maior semelhança catalítica com a catepsina D hepática quando comparada à enzima isolada de baço.
- A hidrólise de sequências do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano sugere que a enzima pode interferir em processos fisiológicos onde a calistatina esteja envolvida.

9. REFERÊNCIAS

Abbott DE, Margaryan NV, Jeruss JS, Khan S, Kaklamani V, Winchester DJ, Hansen N, Rademaker A, Khalkhali-Ellis Z, Henderix MJ. Reevaluating cathepsin D as a biomarker for breast cancer: serum activity levels versus histopathology. *Cancer Biology & Therapy*. 2010 Jan; 9(1):23-30.

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 Sci.* 1975 Aug 15;17(4):613-8.

Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 Oct;68(1):12-28.

Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell.* 2000 Feb 18;100(4):391-8.

Burbach JPH., Prins A, Lebouille JL, Verhoef J, Witter A. Sensitive and rapid amino acid analysis of peptide hydrolysates by high-performance liquid chromatography of o-phthaldialdehyde derivatives. *Journal of Chromatography A* 237 1982 Mar; 339-343.

Capony F, Rougeot C, Montcourrier P, Cavailles V, Salazar G, Rochefort H. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res.* 1989 Jul; 15:49(14):3904-9.

Chao J, Chai KX, Chao L. Tissue kallikrein inhibitors in mammals. *Immunopharmacology.* 1996 May; 32(1-3):67-72.

Clements JA. The glandular kallikrein family of enzymes: tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endocr Rev.* 1989 Nov; 10(4):393-419.

Cooper JB, Khan G, Taylor G, Tickle IJ, Blundell TL. X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol.* 1990 Jul; 5:214(1):199-222.

Del Ciello G, Gomes RAS, Teodoro LGVL, Ferreira HM, Juliano MA, Hial V. Caracterização da atividade cininogénica no líquido pericárdico humano. *Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade Federal do Triângulo Mineiro* 2015 Set.

Dunn BM, Scarborough PE, Lowther WT, Rao-Naik C. Comparison of the active site specificity of the aspartic proteinases based on a systematic series of peptide substrates. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 362:1-9.

Dunn BM. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev.* 2002 Dec; 102(12):4431-58.

Filho IRS, Pereira ICC, Morais LJ, Teodoro LDGVL, Rodrigues MLP, Gomes RADS. Pericardial Parietal Mesothelial Cells: Source of the Angiotensin-Converting-Enzyme of the Bovine Pericardial Fluid. *Arq Bras Cardiol.* 2017 Nov; 109(5):425-431.

Gomes RAS, Chagas JR, Juliano L, Hial V. Met-Lys-bradykinin-Ser, the kinin released from human kininogen by human pepsin. *Immunopharmacology.* 1996 May; 32(1-3):76-9.

Gomes RAS, Juliano L, Chagas JR, Hial V. Characterization of kininogenase activity of an acidic proteinase isolated from human kidney. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997 Jun; 75(6):757-61.

Gomes RAS, Teodoro LDGVL, Lopes IC, Bersanetti PA, Carmona AK, Hial V. Angiotensin-converting enzyme in pericardial fluid: comparative study with serum activity. *Arq Bras Cardiol.* 2008 Sep; 91(3):156-61, 172-8.

Hial V, Keiser HR, Pisano JJ. Origin and content of methionyl-lysyl-bradykinin, lysyl-bradykinin and bradykinin in human urine. *Biochem Pharmacol.* 1976 Nov; 15:25(22):2499-503.

Igarashi S, Takizawa T, Takizawa T, Yasuda Y, Uchiwa H, Hayashi S, Brysk H, Robinson JM, Yamamoto K, Brysk MM, Horikoshi T. Cathepsin D, but not cathepsin E, degrades desmosomes during epidermal desquamation. *Br J Dermatol.* 2004 Aug; 151(2):355-61.

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

Kay J, Dunn BM. Viral proteinases: weakness in strength. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Jan 30;1048(1):1-18.

Lawrence MG, Lai J, Clements JA. Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocr Rev.* 2010 Aug; 31(4):407-46.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, p. 265-75, 1951.

Majewska M, Lipka A, Panasiewicz G, Gowkielewicz M, Jozwik M, Majewski MK, Szafranska B. Identification of Novel Placentally Expressed Aspartic Proteinase in Humans. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 8;18(6):1227. doi: 10.3390/ijms18061227.

Marciniszyn J Jr, Hartsuck JA, Tang J. Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *J Biol Chem.* 1976 Nov 25;251(22):7088-94.

Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ. Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1992 Aug 25;267(24):17082-6.

Morishima H, Takita T, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H. The structure of pepstatin. *J Antibiot (Tokyo).* 1970 May;23(5):263-5. doi: 10.7164/antibiotics.23.263.

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

Osuna E, Pérez-Cárceles MD, Alvarez MV, Noguera J, Luna A. Cardiac troponin I (cTn I) and the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Int J Legal Med.* 1998;111(4):173-6.

Pearl L, Blundell T. The active site of aspartic proteinases. *FEBS Lett.* 1984 Aug 20;174(1):96-101.

Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL. Atividade da catepsina D, gastricsina, pepsina e uropepsina humanas sobre substratos sintéticos relacionados à calistatina humana. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade Federal do Triângulo Mineiro 2009 Set.

Pérez-Cárceles MD, Noguera J, Jiménez JL, Martínez P, Luna A, Osuna E. Diagnostic efficacy of biochemical markers in diagnosis post-mortem of ischaemic heart disease. *Forensic Sci Int.* 2004 May 28;142(1):1-7.

Pimenta DC, Chen VC, Chao J, Juliano MA, Juliano L. α_1 -Antichymotrypsin and kallistatin hydrolysis by human cathepsin D. *Journal of Protein Chemistry*, v.19, p. 411-418. 2000.

Pimenta DC, Oliveira A, Juliano MA, Juliano L. Substrate specificity of human cathepsin D using internally quenched fluorescent peptides derived from reactive site loop of kallistatin. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Jan 12;1544(1-2):113-22.

Pike RN, Bottomley SP, Irving JA, Bird PI, Whisstock JC. Serpins: finely balanced conformational traps. *IUBMB Life.* 2002 Jul ;54(1):1-7.

Pohl J, Dunn BM. Secondary enzyme-substrate interactions: kinetic evidence for ionic interactions between substrate side chains and the pepsin active site. *Biochemistry.* 1988 Jun 28;27(13):4827-34.

Powers JC, Harley AD, Myers DV. Subsite specificity of porcine pepsin. *Adv Exp Med Biol.* 1977; 95:141-57.

Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J.* 2004 Mar 15;378(Pt 3):705-16.

Scarborough PE, Guruprasad K, Topham C, Richo GR, Conner GE, Blundell TL, Dunn BM. Exploration of subsite binding specificity of human cathepsin D through kinetics and rule-based molecular modeling. *Protein Sci.* 1993 Feb; 2(2):264-76.

Schales O. Preparation and properties of rennin. *Journal of American Chemical Society.* 1942;(64):561-64.

Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967 Apr 20;27(2):157-62.

Shabetai R. Function of the normal pericardium. *Clin Cardiol.* 1999 Jan;22(1 Suppl 1):I4-5.

Spyratos F, Maudelonde T, Brouillet JP, Brunet M, Defrenne A, Andrieu C, Hacene K, Desplaces A, Rouëssé J, Rochefort H. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet.* 1989 Nov 11;2(8672):1115-8.

Szokodi I, Horkay F, Kiss P, Selmeçi L, Horváth I, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Juhász-Nagy A, Tóth M. Characterization of canine pericardial fluid endothelin-1 levels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S399-400.

Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med.* 1990 Feb 1; 322(5):297-302.

Tanaka Y, Mine K, Nakai Y, Mishima N, Nakagawa T. Serum pepsinogen I concentrations in peptic ulcer patients in relation to ulcer location and stage. *Gut.* 1991 Aug; 32(8):849-52.

Tang J, Wong RN. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem.* 1987 Jan; 33(1):53-63.

Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, Freiss G, Christensen IJ, Khalaf S, Paolucci F, Pau B, Rasmussen BB, Rose C. Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res.* 1989 Nov 1;49(21):6008-14.

Tunón P, Johansson KE. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods.* 1984 May; 9(2):171-9.

Verhelst SHL. Intramembrane proteases as drug targets. *FEBS J.* 2017 May; 284(10):1489-1502.

Vieira ML, Cury AF, Gustavo N, Oliveira WA, Monaco CG, Cordovil A, Rodrigues AC, Lira Filho EB, Fischer CH, Morhy SS. Ventricular dyssynchrony index: comparison with two-dimensional and three-dimensional ejection fraction. *Arq Bras Cardiol.* 2008 Sep; 91(3):142-7, 156-62.

Wang Y, Liao H, Wang Y*, Zhou J, Wang F, Xie Y, Zhao K and Gao W. *BMC Cardiovasc Disord* - KLK11 promotes the activation of mTOR and protein synthesis to facilitate cardiac hypertrophy. 2021 21:266.

Watanabe M, Kawaguchi S, Nakahara H, Hachimaru T. The roles of natriuretic peptides in pericardial fluid in patients with heart failure. *Clin Cardiol.* 2009 Mar; 32(3):159-63.

Xiang F, Guo X, Chen W, Wang J, Zhou T, Huang F, Cao C, Chen X. Proteomics analysis of human pericardial fluid. *Proteomics.* 2013 Sep; 13(17):2692-5.

Yamac AH, Sevgili E, Kucukbuzcu S, Nasifov M, Ismailoglu Z, Kilic E, Ercan C, Jafarov P, Uyarel H, Bacaksiz A. Role of cathepsin D activation in major adverse cardiovascular events and new-onset heart failure after STEMI. *Herz.* 2015 Sep;40(6):912-20.

Zhou GX, Chao L, Chao J. Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *J Biol Chem.* 1992 Dec 25;267(36):25873-80.

ANEXO A

FACULDADE DE MEDICINA DO TRIÂNGULO MINEIRO (FMTM)
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)
PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS

I - IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO -PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ASPARTIL-PROTEASE(S) NO LÍQUIDO PERICÁRDICO HUMANO.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL - Roseli Aparecida da Silva Gomes

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA - Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro

DATA DE ENTRADA NO CEP/FMTM - 20/08/99

PROTOCOLO CEP/FMTM - 0022

II - SUMÁRIO DO PROJETO

OBJETIVOS

Purificar e caracterizar a(s) aspartil-protease(s) presente(s) no líquido pericárdico humano e a verificação da propriedade cininoliberadora.

JUSTIFICATIVA

Glenn e Lefer (1970) descreveram que as enzimas lisossomais exercem um papel indesejável no choque irreversível¹ e segundo Ricciutti (1972) a rotura de lisossomos cardíacos no miocárdio isquêmico poderia promover dano cardíaco após o infarto do miocárdio. Spath e colaboradores (1974) mostraram que na isquemia miocárdica experimental a quantidade de enzimas lisossomais no miocárdio diminui, enquanto a atividade enzimática "livre" aumenta, o que sugere uma importante rotura lisossomal na porção isquêmica do miocárdio.

A atividade aumentada de catepsina D na linfa cardíaca, no líquido pericárdico e plasma foi observada em cães com isquemia do miocárdio (Araki e Takenaka, 1975).

Os níveis de cininas do sangue dos seios coronário e aórtico do cão aumentam após a oclusão da artéria coronária (Kimura e cols, 1973; Hashimoto e cols, 1977; Matsuki e cols, 1987). Níveis elevados de cininas plasmáticas têm sido relatados em pacientes com isquemia miocárdica (Hashimoto e cols, 1978).

Nolly e cols (1981) relataram a presença de uma protease ácida em tecido cardíaco que liberava uma substância vasodilatadora a partir do plasma. Posteriormente, Nolly e cols (1983) detectaram uma enzima similar nas artérias mesentéricas de rato a qual liberava uma substância vasodilatadora tipo cinina e que era inibida pela pepstatina A. Zeitlin e cols (1989) descreveram a presença de uma atividade proteásica ácida na artéria coronária de cão, a qual libera um peptídeo vasodilatador capaz de contrair a musculatura lisa de útero. Moshi e cols (1992) usando extratos de tecido ventricular e aorta de cão detectaram a presença de substância que contraía a musculatura uterina liberada em pH 5.2 a 5.4 mas não, em pH alcalino. A presença de aspartil - proteases no músculo cardíaco e no líquido pericárdico já foi demonstrada, entretanto a caracterização físico-química e a atividade cininoliberadora dessa(s) enzima(s) ainda não foi realizada. De posse desses dados os pesquisadores propõem a purificação e caracterização da(s) aspartil-protease(s) presente(s) no líquido pericárdico humano e a verificação da propriedade cininoliberadora.

DESCRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA - A(s) enzima(s) será(ão) purificada(s) a partir de 500 ml de líquido pericárdico humano obtido à necropsia, de cadáveres sem alterações cardiovasculares, no serviço de verificação de óbito do Hospital Escola da FMTM.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO - Será considerado como critério de exclusão cadáveres com alterações cardiovasculares.

ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA -

A purificação será feita utilizando cromatografia de filtração em gel em Resina Sephadex G 150 (Biorad) e cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q 5/5 HR em sistema FPLC. Todas as etapas serão seguidas de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. A atividade proteolítica será determinada utilizando substrato sintético fluorogênico contendo sequência específica para aspartil protease → Abz-KPIEFFRL-Eddnp, em espectrofluorômetro Hitachi F 2000. A caracterização físico-química constará da determinação da massa molecular da(s) enzima(s) purificada(s) através de eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS, filtração em gel e das constantes cinéticas utilizando substratos sintéticos contendo sequências do cininogênio humano. A atividade cininoliberadora será feita utilizando plasma humano, obtido de doadores voluntários do Hemocentro - HE-FMTM, inativado a 56 °C (segundo Henriques e Allan, 1972) e ensaio biológico em útero de rato montado em banho de Dale. Os pontos de clivagem nos substratos sintéticos serão determinados utilizando sequências N e C-terminais em torno da metionil-lisil-bradicinina, fornecidos pelo Departamento de Biofísica da UNIFESP/EPM. A incubação será seguida de purificação dos fragmentos liberados através de HPLC de fase reversa em coluna de octadecilsilano. Os peptídeos purificados serão submetidos a hidrólise ácida seguida de análise de aminoácidos em sistema HPLC, utilizando derivatização com O-ftalaldeído segundo Burbach e cols (1982) A identificação da(s) cinina(s) liberada(s) será(ão) realizada(s) pela incubação da(s) enzima(s) purificada(s) com cininogênios de alto e baixo peso molecular seguido de purificação e sequenciamento. Os dados obtidos neste trabalho serão submetidos apenas à uma análise estatística descritiva.

ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES -

A pesquisa será desenvolvida no O laboratório de pesquisa em Bioquímica da FMTM o qual já consta com todo o equipamento necessário para a execução do projeto, visto que no mesmo já são desenvolvidos outros projetos de

Roseli Aparecida da Silva Gomes

FACULDADE DE MEDICINA DO TRIÂNGULO MINEIRO (FMTM)	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	
PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROJETO DE PESQUISA COM ENVOLVIMENTO DE SERES HUMANOS	
TÍTULO DO PROJETO - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ASPARTIL-PROTEASE(S) NO LÍQUIDO PERICÁRDICO HUMANO.	
PESQUISADORA RESPONSÁVEL - Roseli Aparecida da Silva Gomes	PROTOCOLO CEP/FMTM - 0022

pesquisa envolvendo a purificação de proteínas, com especial ênfase para as cininogenases (enzimas liberadoras de cininas) e cininasas (enzimas que hidrolisam cininas), dentro da mesma linha de pesquisa do projeto agora proposto.

III – COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES
ESTRUTURA DO PROTOCOLO - O protocolo foi adequado para atender às determinações da Resolução CNS 196/96
JUSTIFICATIVA DO USO DE PLACEBO – Não pertinente.
JUSTIFICATIVA DE SUSPENSÃO TERAPÊUTICA (“Wash out”) – Não pertinente.
ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS -
 Como trata-se de material de necropsia, o único risco é a perda de confidencialidade e como medida preventiva os pesquisadores utilizarão números para identificação. Os resultados trarão melhor compreensão dos mecanismos de ação da enzima purificada que atua na regulação da pressão arterial, o que justifica o único risco da perda de confidencialidade ser irrelevante.
RETORNO DE BENEFÍCIOS PARA O SUJEITO E/OU PARA A COMUNIDADE – Espera-se que a obtenção da enzima purificada permitirá a caracterização físico-química da proteína, bem como a determinação de sua atividade liberadora de Angiotensina II. E assim uma melhor compreensão dos mecanismos de ação da enzima purificada que atua na regulação da pressão arterial.
ADEQUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO E FORMA DE OBTÊ-LO – Justifica-se não obter o consentimento livre e esclarecido por se tratar de material proveniente de necropsias.
INFORMAÇÃO ADEQUADA QUANTO AO FINANCIAMENTO – O pesquisador não terá remuneração além daquela referente ao cargo de professor da FMTM.

**IV – PARECER DO CEP
(APROVADO)**

V – DATA DA REUNIÃO
24/03/2000


 GILBERTO A. PEREIRA - relator


 SEBASTIÃO TÓSTES JUNIOR - coordenador

APÊNDICE A

30/06/2022 15:23

ScholarOne Manuscripts



Arquivos Brasileiros de Cardiologia

[Início](#)[Autor](#)

Confirmação da submissão

[Imprimir](#)

Obrigado pela sua submissão

Submetido para

Arquivos Brasileiros de Cardiologia

ID do manuscrito

ABC-2022-0475

Título

Caracterização de uma aspartil peptidase do fluido pericárdico humano

Autores

Alves, Kaiky

Gomes, Roseli

Martins, Rhéltheer

Data da submissão

30-jun-2022

Painel do autor

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2022. Todos os direitos reservados.

ScholarOne Manuscripts e ScholarOne são marcas registradas da ScholarOne, Inc.

Patentes da ScholarOne Manuscripts N° 7.257.767 e N° 7.263.655.

[@ScholarOneNews](#) | [Requisitos do sistema](#) | [Declaração de privacidade](#) | [Termos de uso](#)

Caracterização de uma aspartil peptidase do fluido pericárdico humano utilizando peptídeos fluorescentes em torno da sequência do sítio reativo da calistatina

Characterization of a human pericardial fluid aspartic peptidase using fluorescent peptides around the sequence of the reactive site of the calistatin

Kaiky Neves De Aquino Alves, Rhéltheer de Paula Martins e Roseli Aparecida Da Silva Gomes

Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas área I – Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM.

Resumo:

Fundamento: As aspartil peptidases são enzimas que apresentam preferências bem distintas no que se refere às interações entre os resíduos dos aminoácidos do sítio catalítico. Essas diferenças são importantes do ponto de vista biológico, porque em cada tecido/célula há condições e necessidades metabólicas próprias, de acordo com os componentes químicos/bioquímicos disponíveis no meio, tais como substratos, cofatores, inibidores e produtos.

Objetivo: Caracterizar a atividade hidrolítica de uma aspartil peptidase isolada do fluido pericárdico humano.

Método: Uma aspartil peptidase do fluido pericárdico humano foi purificada através de etapas cromatográficas e os parâmetros cinéticos foram determinados de acordo com cada substrato sintético modificado no sítio reativo da calistatina.

Resultados: A enzima isolada apresentou uma massa molecular aparente de 141 kDa e a atividade de aspartil peptidase foi observada apenas nessa região de massa molecular. Os dados obtidos da cinética enzimática nos mostraram que a mudança na posição do aminoácido P₁' influenciou significativamente na sua atividade.

Conclusões: Os resíduos de aminoácidos de substratos sintéticos modificados no sítio reativo da calistatina influenciaram de forma significativa na atividade da aspartil peptidase do fluido pericárdico. A isoforma pericárdica de aspartil peptidase apresenta maior semelhança catalítica

com a catepsina D hepática quando comparada à enzima isolada de baço. A hidrólise de sequências do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano sugere que a enzima pode interferir em processos fisiológicos nos quais a calistatina esteja envolvida.

Palavra-chave: Aspartil Peptidase; Fluido Pericárdico; Calistatina; Cinética Enzimática.

Abstract:

Background: Aspartyl peptidases are enzymes that have very different preferences, with regard to the interactions between the amino acid residues of the catalytic site. These differences are important from a biological point of view, because each tissue/cell has its own metabolic conditions and needs, according to the chemical/biochemical components available in the medium, such as substrates, cofactors, inhibitors and products.

Objective: To characterize the hydrolytic activity of an aspartyl peptidase isolated from human pericardial fluid.

Method: An aspartyl peptidase from human pericardial fluid was purified through chromatographic steps and the kinetic parameters were determined according to each synthetic substrate modified at the reactive site of callistatin.

Results: The isolated enzyme had an apparent molecular mass of 141 kDa. Aspartyl peptidase activity was observed only in this molecular mass region. The data obtained from enzymatic kinetics showed us that the change in the position of the P1' amino acid significantly influenced its activity.

Conclusions: The amino acid residues of synthetic substrates modified in the reactive site of calistatin significantly influenced the activity of aspartyl peptidase in the pericardial fluid. The pericardial isoform of aspartyl peptidase shows greater catalytic similarity with hepatic cathepsin D when compared to the enzyme isolated from the spleen. The calistatin reactive site sequences' hydrolysis by aspartyl peptidase from human pericardial fluid suggests that the enzyme can interfere with physiological processes in which calistatin is involved.

Keywords: Aspartyl Peptidase; Pericardial Fluid; Calistatin; Enzymatic Kinetics.

Introdução

As aspartil peptidases são largamente distribuídas na natureza e suas funções vão desde a digestão inespecífica de proteínas até processos especializados de hidrólise de substratos proteicos. Na família das peptidases aspárticas A1, estão incluídas a maioria das endopeptidases aspárticas encontradas no organismo humano que são mecânica e estruturalmente relacionadas.¹ Quase todas as enzimas desta família atuam em pH ácido² e são inibidas por pepstatina A, um inibidor específico e competitivo, que se liga fortemente aos resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo.³ A ligação das aspartil peptidases aos substratos ocorre em uma fenda capaz de interagir com até sete resíduos de aminoácidos da enzima (S_4 a S_3') de acordo com a designação de Schechter e Berger.⁴ Ainda como característica, os substratos devem possuir cadeias mais estendidas e cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos⁵ interagindo nos subsítios S_1 e S_1' da enzima, modelo frequentemente utilizado na proposta de síntese de substratos específicos para aspartil peptidases.⁶

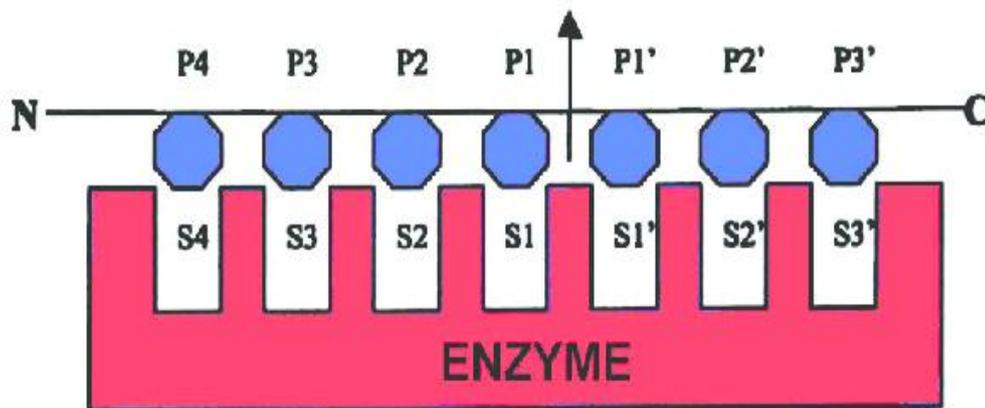


Figura 2. Designação de Schechter e Berger. Sítios de ligação do substrato no sítio ativo da enzima (S_4 a S_3'); resíduos de aminoácidos do substrato (P_4 a P_3'). A seta indica o ponto de clivagem.⁴

As peptidases aspárticas humanas, por muito tempo, têm sido alvo de pesquisas médicas e farmacêuticas pela sua ocorrência em muitos tecidos, fluidos biológicos e seu envolvimento em várias doenças, como hipertensão⁷, maturação do vírus da imunodeficiência humana⁸, formação de úlceras gástricas⁹, neoplasias¹⁰⁻¹² e liberação de peptídeos biologicamente ativos.¹³⁻¹⁵ A

presença de cininogenases ácidas foram descritas no tecido vascular com atividade de catepsina D na aorta e no ventrículo esquerdo em cães (Moshi MJ et al., 1992). Uma aspartil peptidase também foi caracterizada com uma atividade cininogenásica.¹⁵ A pepsina, uma outra importante aspartil peptidase, foi associada a liberação de cinina (Met-Lys-Bradykinin-Ser) pela clivagem do cininogenio.¹⁴ As cininas são peptídeos de baixo peso molecular que participam dos processos inflamatórios devido a sua capacidade de ativar células endoteliais e, como consequência, provocar vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, produção de óxido nítrico e mobilização do ácido araquidônico. As cininas também estimulam terminações nervosas sensoriais e os parâmetros inflamatórios como rubor, calor, edema e dor, podem resultar do processo de formação de cininas.¹⁶ O fluido pericárdico contido na cavidade pericárdica é um fluido seroso, complexo e dinâmico, secretado pelas células mesoteliais que estão em contato com o coração e cuja composição reflete seu status fisiológico. Várias enzimas já tiveram suas atividades detectadas e caracterizadas no líquido pericárdico. A catepsina D é liberada para o espaço intersticial durante a isquemia do miocárdio.¹⁷ Uma enzima conversora de angiotensina foi isolada e caracterizada do fluido pericárdico humano, bem como, foi observada que a atividade enzimática era maior no fluido pericárdico humano do que no plasma de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, sugerindo uma origem local para a enzima.¹⁸ Experimentos utilizando pericárdio bovino demonstraram que uma enzima conversora de angiotensina é produzida pelas células mesoteliais do pericárdio parietal.¹⁹⁻²⁰ A atividade de aspartil peptidase no fluido pericárdico humano foi evidenciada em estudo anterior, suscetível à inibição pela pepstatina A e com atividade cininogenásica.²¹ Esses dados mostram que o pericárdio não é apenas uma membrana para conter um fluido lubrificante e que a composição do fluido pericárdico além de ser indicador de processos que acontecem no miocárdio através da transudação de moléculas, ainda apresenta síntese local de fatores com ação parácrina para o próprio miocardiócito. A calistatina, é uma proteína de ligação à calicreína tecidual²² e foi identificada como um membro da superfamília das serpinas (*serine protease inhibitors*) que exercem importantes papéis na manutenção de vários sistemas fisiologicamente importantes. A composição do sítio reativo da calistatina humana é único entre todas as serpinas e ideal para a ligação com a calicreína tecidual. Substituições de aminoácidos nas posições P2 e P1 através de mutagênese sítio-dirigida mostraram que a Phe (P1) é essencial, pois cria um ambiente hidrofóbico para a interação da calicreína com a calistatina.²³ As aspartil proteases acomodam nos subsítios S₁ e S₁' substratos com cadeias mais estendidas e cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos⁵, modelo frequentemente utilizado na proposta de síntese de substratos específicos para essa classe de enzimas.⁶ A sequência Lys-Pro-Ala-Lys-Phe-*Nph-Arg-Leu (P5 P4 P3 P2

P1 *P1' P2' P3'), onde * sinaliza o ponto de hidrólise, se mostrou bastante adequada como substrato para a atividade da pepsina porcina.²⁴ Ensaios utilizando essa sequência como base, mostraram que variações de resíduos nas posições P2 e P3 afetaram a catálise pela catepsina D, não acomodando um resíduo positivamente carregado na posição P2.²⁵ Ensaios utilizando catepsina D isolada de baço, gastricsina, pepsina e uropepsina humanas, para a hidrólise dos peptídeos Abz-AIKFFSRQ-Eddnp, Abz-AIAFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp e Abz-AISFFSRQ-Eddnp, da série usada em outro estudo²⁶, mostraram clivagem na ligação Phe-Phe, e que o resíduo Leu na posição P2 foi a substituição que mais afetou a atividade catalítica para as quatro enzimas testadas. Para a gastricsina, pepsina e uropepsina a melhor atividade catalítica observada foi aquela com Lys em P2. A catepsina D de baço apresentou melhor atividade catalítica com Ala em P2.²⁸ Esses dados sugerem que a cadeia lateral ramificada interfere na interação na posição P2 mais significativamente do que o volume da cadeia lateral, considerando o grupamento ϵ -amino do resíduo Lys em P2.²⁸ Uma aspartil peptidase suscetível à inibição pela pepstatina A, foi purificada a partir do fluido pericárdico humano. Esta enzima apresentava atividade cininogénica em meio ácido.²¹ Entretanto, a caracterização das propriedades catalíticas de aspartil peptidase do fluido pericárdico frente as mudanças de resíduos de aminoácidos que flanqueiam o ponto de clivagem ainda não foi realizada e poderá trazer informações importantes sobre o comportamento dessa enzima quanto às interações em seu sítio ativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do fluido pericárdico

O fluido pericárdico humano foi obtido junto à necropsia de cadáveres sem alterações cardiovasculares no Serviço de Verificação de Óbito do Hospital de Clinicas da UFTM, dialisado contra água destilada e liofilizado. Projeto aprovado pelo CEP-FMTM (Protocolo CEP/FMTM – 0022, aprovado em 24/03/2000). As etapas de purificação incluíram:

Dosagem de proteínas²⁹

Preparar solução de trabalho, misturando os reagentes abaixo nas seguintes proporções:

Na ₂ CO ₃ a 2% em NaOH 0,5 N.....	14,7 mL
Tartarato de sódio e potássio a 2%.....	0,15 mL
CuSO ₄ 5H ₂ O a 0,64%.....	0,15 mL

Para determinação da concentração de produtos, foi misturado 0,1 mL da amostra ou padrões com 1,0 mL da solução de trabalho, após a homogeneização e repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado à mistura 0,4 mL do reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção de 1:1 com água destilada preparada no momento do uso. A mistura foi agitada cuidadosamente e deixada em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram realizadas leituras de absorvância a 650 nm e as concentrações determinadas utilizando uma curva padrão de soroalbumina bovina obtida nas mesmas condições do ensaio.

Curva padrão para soroalbumina bovina:

Tabela 4. Parâmetros para construção da curva a partir da solução de soroalbumina bovina 0,1 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%):

Tubos	Concentração (µg)	Padrão (µL)	NaCl 0,9% (µL)
1	5	50	950
2	10	100	900
3	20	200	800
4	40	400	600
5	50	500	500
6	70	700	300
7	80	800	200
8	100	1.000	0

Cromatografia em coluna de resina Cibacron Blue Agarose® (Bio-Rad)

A coluna com dimensões de 12 cm de altura x 3,0 cm de diâmetro foi equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. O fluido pericárdico humano liofilizado (3,2 g) foi reconstituído em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Alíquotas de 3,0 mL

(contendo 54 mg de albumina) foram aplicadas à coluna em resina Cibacron blue agarose® (Bio-Rad). Após a aplicação na coluna, a atividade enzimática foi testada antes e após a centrifugação sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0. Os pools contendo um volume total de 650 mL, foram centrifugados a 10.000 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação, se obteve um volume aproximado de 600 mL. Neste volume, foram realizados testes de atividade enzimática sendo que, para cada teste foi utilizado 100 µL destes volumes como amostra. A cada etapa de purificação procedeu-se à análise do grau de pureza e avaliação da massa molecular aparente através de eletroforese em gel de poliácridamida a 13% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições redutoras e não-redutoras. O substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, sequência clássica e suscetível à hidrólise por aspartil proteases (Pohl J e Dunn BM, 1988), foi utilizado nas etapas subsequentes de purificação.

Cromatografia em coluna de resina Q-Sepharose® (Pharmacia)

À coluna contendo resina Q-Sepharose® (Pharmacia) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, foi aplicado o efluente centrifugado da coluna de Cibacron blue agarose® (Bio-Rad). Frações de 8,0 ml foram coletadas, a absorbância em 280 nm foi determinada até que as leituras atingissem valor igual àquela do tampão de equilíbrio da coluna. A seguir foi feito um gradiente utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e contendo concentrações crescentes de NaCl (0,2 a 1,0 M). Frações de 3,0 mL de volume foram coletadas. Todas as frações foram testadas para atividade enzimática sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas, concentradas em tubos de centrifugação (Vivaspin®Turbo 15 RC), centrifugadas a 5.000 rpm, 4°C (3.900 g), por 30 minutos.

Cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia)

A amostra contendo atividade enzimática foi aplicada em alíquotas de 0,5 mL em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia) com dimensões de 30 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro. Foi utilizado um fluxo de 0,4 mL por minuto. A coluna foi equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, contendo NaCl 1,0 M para estimar a massa molecular. Frações de 2,0 mL foram coletadas e a absorbância determinada em 280 nm. Todas as frações foram testadas para atividade enzimática sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Padrões de massa molecular gama globulina bovina (150 kDa), soroalbumina

bovina (65 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C (12,4 kDa) foram utilizados para construção da curva para estimativa da massa molecular. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e concentradas em tubos de centrifugação (Vivaspin® Turbo 15 RC), centrifugadas a 5.000 rpm, 4°C (3.900 g), por 30 minutos. O material concentrado foi utilizado para as etapas de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e cinética enzimática.

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)³⁰

As etapas de purificação foram acompanhadas de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 13% das frações contendo atividade de aspartil peptidase. As amostras foram diluídas em tampão de amostra, colocadas em banho maria em ebulição por 5 minutos, centrifugadas (5.000 rpm) por 2 minutos e aplicadas às canaletas. Como padrão de massa molecular foi usada a soroalbumina bovina (65 kDa) submetida às mesmas condições da amostra e colocada em uma canaleta separada. A corrida eletroforética foi feita em voltagem constante 120V utilizando fonte Bio-Rad (modelo 1000/500). Os géis foram corados pela prata amoniacal (Tunón P, Johanson KE, 1984). A amostra foi aplicada em condições redutoras com β -mercaptoetanol e não redutoras. A cada etapa de purificação procedeu-se à análise do grau de pureza e avaliação da massa molecular aparente através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS).

Estimação da massa molecular aparente por cromatografia de filtração em gel em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia)

Para estimar a massa molecular aparente procedeu-se à cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia) juntamente com padrões de massas moleculares conhecidas. Após a cromatografia, foi feito o cálculo do coeficiente de partição (K_{av}) dos padrões e da amostra aplicando-se a fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

onde:

V_e = volume de eluição da amostra; V_o = volume vazio da coluna dado pelo volume de eluição do azul dextran; V_t = volume total da coluna.

Os valores encontrados foram registrados, sendo os valores do K_{av} colocados no eixo das abscissas e os valores de massa molecular dos padrões no eixo das ordenadas (escala logarítmica). A massa molecular aparente da proteína purificada foi estimada pela interpolação gráfica do valor K_{av} obtido.

Determinação das constantes catalíticas

Substratos Sintéticos

Os substratos utilizados foram Abz-Ala-Ile-Lys-Phe-Phe-Ser-Ar-Gln-Eddnp (Abz-AIKFFSRQ-Eddnp), Abz-Ala-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-Eddnp (Abz-AIAFFSRQ-Eddnp), Abz-Ala-Ile-Leu-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-Eddnp (Abz-AILFFSRQ) e Abz-Ala-Ile-Ser-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-Eddnp (Abz-AISFFSRQ-Eddnp), sendo o radical Abz o ácido orto-amino benzóico e o radical Eddnp o N-[2,4-dinitrofenol]-etilenodiamino. Os substratos foram sintetizados e gentilmente fornecidos pelo Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) pelos professores Luiz Juliano e Maria Aparecida Juliano. Foi preparada uma solução estoque (1,0 mg/mL) solubilizando os substratos em 20 μ L de dimetilformamida (Nuclear) e completando-se o volume com água Milli-Q (Millipore Simplicity).

Determinação do pH ótimo

A determinação do pH ótimo foi feita incubando-se a enzima purificada com os substratos em tampões com valores de pH que variaram de 4,0 a 8,0 com intervalos de 1,0 unidade de pH (4,0 e 5,0), acetato de sódio 0,2 M, Chemco; pH 6,0, fosfato monobásico de sódio 0,2 M, Synth; pH 7,0 e 8,0, tris-(hidróximetil)-aminometano 0,2 M, Nuclear). As incubações foram feitas em cubeta termostaticada e sob agitação contínua, na proporção de 1,89 mL de tampão, 100 μ L de cada substrato na concentração de 1 mg/mL e 10 μ L da enzima. As leituras de fluorescência foram feitas em espectrofluorômetro RF-5301PC (Shimadzu), durante 50 minutos, com registro a cada 10 minutos, empregando comprimento de onda de excitação de 320 nm e de emissão de 420 nm. A variação de fluorescência por minuto ($\Delta f/\text{minuto}$) foi convertida em μ M por litro por minuto ($\mu\text{M} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1}$).

Determinação dos pontos de clivagem

A determinação dos pontos de clivagem já foi realizada em um estudo anterior.²⁸ As enzimas purificadas foram incubadas com os substratos sintéticos e os fragmentos liberados foram analisados em HPLC de fase reversa, em coluna octadecilsilano (C18) Lichrospher-Hibar 100 RP-18 (Merck) medindo 5,0 x 125 mm com partículas de 4,0 µm de diâmetro, conectada a um sistema de duas bombas injetoras modelo LC9A (Shimadzu). Alíquotas de 100 µL da mistura de incubação foram submetidas a um gradiente de acetonitrila (Merck) contendo ácido trifluoracético (Carlo Erba) em uma concentração final de 0,1%. Como solvente A foi utilizada acetonitrila a 20% em água deionizada e como solvente B, acetonitrila a 100%, sendo que o fluxo foi de 1,0 mL por minuto. A detecção dos produtos de hidrólise foi feita em 214 nm por um detector de luz UV/visível modelo SPD 6AV (Shimadzu), acoplado em série com um detector de fluorescência modelo RF535 (Shimadzu), utilizando comprimento de onda de excitação de 320 nm e de emissão 420 nm. O registro foi feito através de um registrador modelo CR4A Chromatopac (Shimadzu). Também foram feitas incubações dos substratos com as enzimas purificadas e com seu inibidor específico a Pepstatina A.

Análise de aminoácidos pelo método da pré-derivatização³¹

Foi realizada a análise dos aminoácidos dos fragmentos liberados da incubação das enzimas com os substratos fluorogênicos. Os fragmentos fluorescente e não fluorescente resultantes foram recolhidos em frascos separados, liofilizados, reconstituídos com água deionizada e colocados em ampolas. A cada ampola acrescentou-se 0,05 ml de ácido clorídrico/ácido propiônico (Sigma) (50:50) 4,0 N, as ampolas foram lacradas e colocadas em estufa a 110°C durante 24 horas para hidrólise. Em seguida as ampolas foram abertas e secas à vácuo. Depois de secas, adicionou-se 0,2 ml de tampão borato de sódio (Merck) 0,1 M pH 9,1. Os 4 reagentes utilizados na pré-derivatização dos aminoácidos foram: tampão borato (Merck) 0,1 M pH 9,1 com 10 µL de β-mercaptoetanol (Merck) (reagente 1) e tampão borato de sódio (Merck) 0,1 M pH 9,1 ao qual foram adicionados 5,0 mg de *o*-phtalaldeído (Merck) previamente dissolvidos em 1,5 ml de etanol (Merck) (reagente 2). A coluna utilizada foi octadecilsilano (C18) Lichrocart-hibar 15542 medindo 4,0 x 125 mm com partículas de 4,0 µm de diâmetro (Merck) em sistema HPLC (Shimadzu). Foi feito gradiente utilizando como solvente A, citrato de sódio

0,1 M (Mallinckrodt), ácido bórico 0,1 M, pH 6,5, contendo metanol LiChrosolv® 20% e como tampão B, metanol 100%. Como padrão foi utilizado padrão de aminoácidos Sigma.

Determinação das constantes catalíticas K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M

Os parâmetros K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M foram determinados para cada um dos substratos, utilizando tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 4,5 em cubeta termostatizada a 37° C, em espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu). A (λ_{Ex} 320 nm; λ_{Em} 420 nm). A variação de fluorescência por minuto ($\Delta f/\text{minuto}$) foi convertida em μM por litro por minuto ($\mu\text{M} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). A constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram deduzidas das velocidades de catálise medidas com diferentes concentrações de cada substrato. As velocidades da reação sobre concentrações crescentes de cada um destes substratos foram medidas através da formação do produto da ação enzimática, verificada por fluorimetria. Em seguida, foi feito um gráfico no qual os valores das concentrações crescentes de substrato [S] foram plotados no eixo X e os valores das velocidades de reação (μM de produto formado) foram plotados no eixo Y (gráfico de Michaelis-Menten). Foi feito também um gráfico de $1/[S]$ no eixo X e $1/V$ no eixo Y ou gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk, para facilitar a visualização dos parâmetros e determinação da K_M e de $V_{m\acute{a}x}$ por interpolação gráfica. As concentrações dos substratos foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar do etilenodiaminodinitrofenol Eddnp ($\epsilon_{365} = 17.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressas em micromolar (μM).

Titulação do sítio ativo com pepstatina A

A titulação do sítio ativo enzimático foi realizada com o inibidor da pepstatina A Isovaleril-Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA, Sigma, um hexapeptídeo semelhante ao estado de transição dos substratos normais (Morishima H et al., 1970). Foram feitas incubações com o inibidor nas concentrações de $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ a $7,4 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, utilizando uma concentração constante de $2,347 \mu\text{M}$ da enzima, sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 (q.s.p. 2,0 de volume final). A atividade enzimática foi dada pela variação de fluorescência por unidade de tempo determinada para cada uma das concentrações do inibidor. Os resultados foram plotados e calculados no Origin Pro Enzyme Kinetics (OriginLab Technical Support), um programa específico para cinética enzimática.

RESULTADOS

Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). A concentração de proteínas no fluido pericárdico foi estimada em 5566,98 $\mu\text{g/mL}$. Após aplicar a amostra do fluido pericárdico à coluna de resina Cibacron Blue Agarose® (Bio-Rad), a concentração de proteínas na amostra foi estimada 221,29 $\mu\text{g/mL}$. Não foram realizadas novas dosagens de proteína após as cromatografias subsequentes, foram feitas correlações de acordo com as novas leituras em absorvância de 280 nm.

Cromatografia em coluna de resina Cibacron Blue Agarose® (Bio-Rad)

A cromatografia em coluna de resina Cibacron Blue Agarose® (Bio-Rad) foi utilizada para retirar a albumina da amostra. Nesta etapa, foram aplicadas alíquotas de 3,0 mL por fração e estimada a concentração de proteínas em 280 nm. A coluna foi equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e a sua atividade enzimática testada antes e após a centrifugação.

Cromatografia em coluna de resina Q-Sepharose® (Pharmacia)

Nesta etapa da purificação, foi aplicado o efluente centrifugado da coluna de Cibacron blue agarose® (Bio-Rad). A seguir foi feito um gradiente utilizando tampão fosfato de sódio contendo concentrações crescentes de NaCl. Alíquotas de 3,0 mL foram coletadas e testadas para atividade enzimática. A cromatografia realizada em concentrações crescentes de NaCl, mostra que a atividade enzimática foi eluída em uma concentração de 0,5 M de NaCl. No gráfico, o quadro delimitado pela linha pontilhada indica quais foram as frações utilizadas na etapa de cromatografia subsequente.

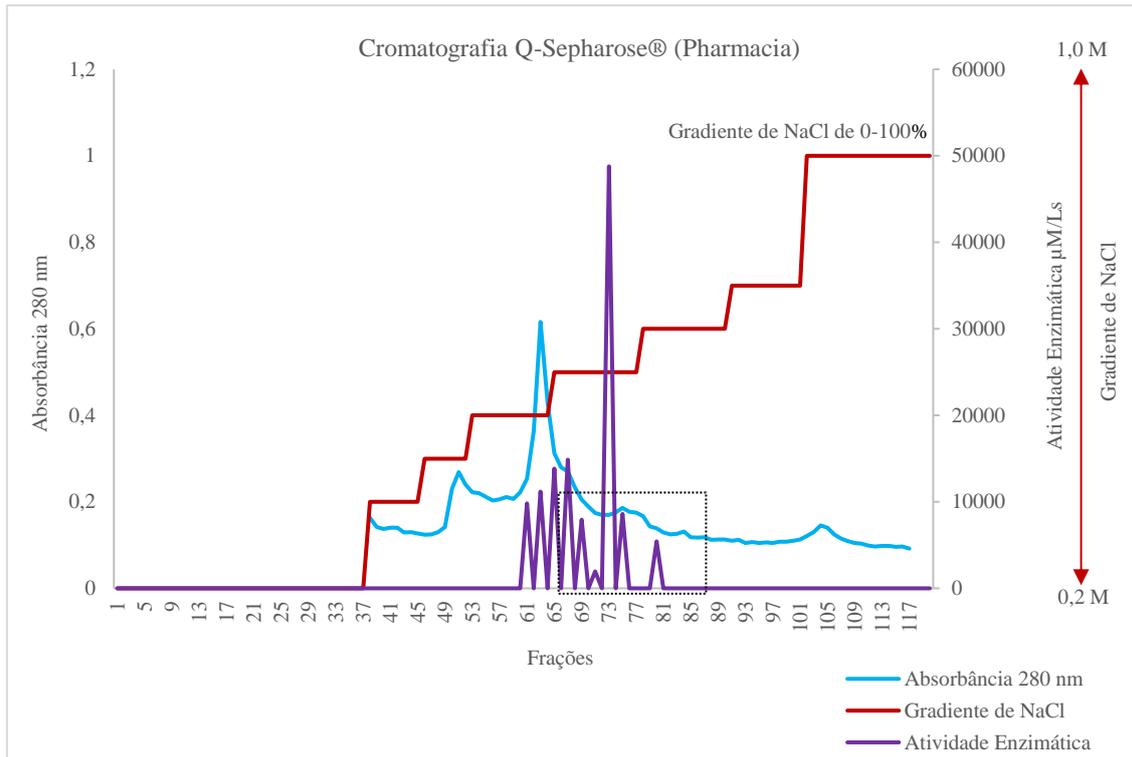


Figura 2. Cromatografia de coluna Q-Sepharose® (Pharmacia) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Foi feito um gradiente utilizando tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 6,0 contendo concentrações crescentes de NaCl (0,2 a 1,0M). Alíquotas de 3,0 mL foram coletadas e testadas para atividade enzimática sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0.

Cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia)

A amostra contendo atividade enzimática foi aplicada em alíquotas de 0,5 mL à coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia). Frações 3,0 mL foram coletadas e testadas para atividade enzimática. A massa molecular da enzima foi estimada através da cromatografia em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia). As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e concentradas. O material concentrado foi utilizado nas etapas de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e cinética enzimática. No gráfico, o quadro delimitado pela linha pontilhada indica quais foram as frações que apresentaram atividade enzimática.

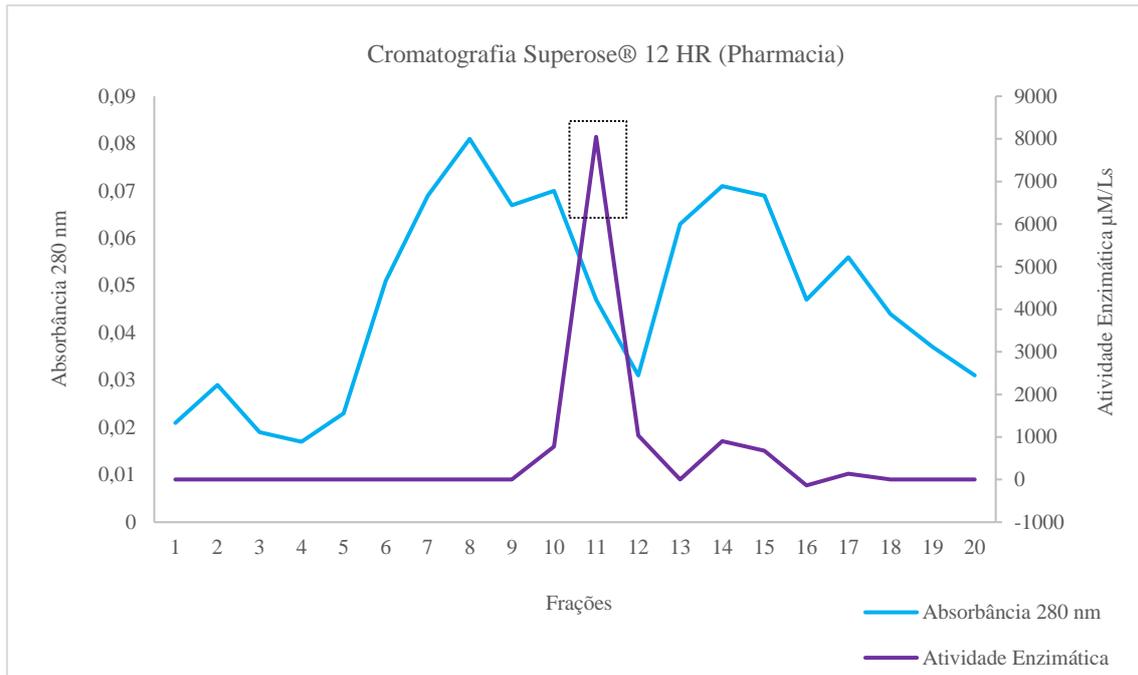


Figura 3. Cromatografia de coluna Superose® 12 HR (Pharmacia) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Foi feito um gradiente utilizando tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 6,0 contendo concentrações crescentes de NaCl (0,2 a 1,0M). Frações 3,0 mL foram coletadas e todas foram testadas para atividade enzimática sobre o substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0.

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)³⁰

A Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) mostra que a proteína isolada aparece como uma única banda com massa molecular superior à albumina bovina usada como padrão.



Figura 4. Eletroforese em gel poliacrilamida a 13% contendo SDS coradas pela prata amoniacal. Em 1 – Padrão de massa molecular 64 KDa (soroalbumina bovina), 2 e 3 – Amostra sem β -mercaptoetanol (condições não redutoras).

Estimação da massa molecular aparente por cromatografia de filtração em gel

Padrões de massa molecular conhecida foram utilizados para estimativa da massa molecular da aspartil peptidase do fluido pericárdico humano. A massa molecular da amostra foi estimada em 141 kDa.

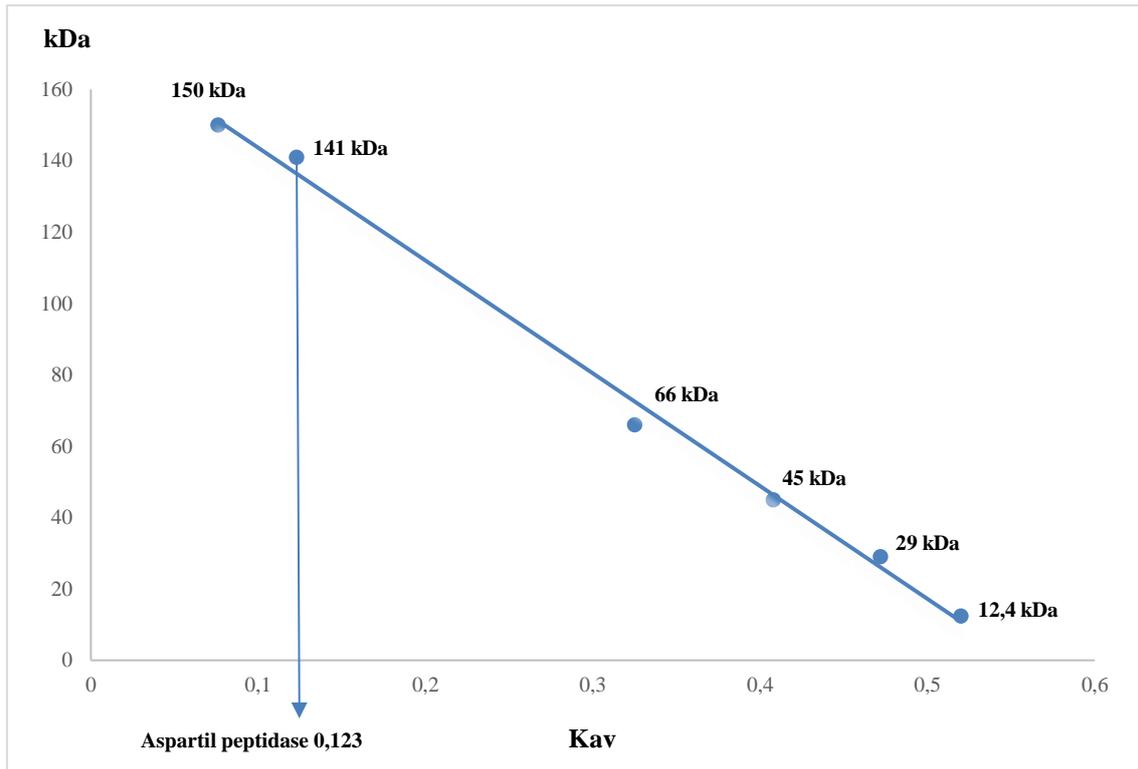


Figura 5. Estimativa da massa molecular da amostra contendo a aspartil peptidase do fluido pericárdico humano e padrões de massa molecular conhecida (gama globulina bovina 150 kDa, soroalbumina bovina 65 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 29 kDa e citocromo c 12,4 kDa).

Determinação do pH ótimo

O pH ótimo para a atividade da aspartil peptidase isolada neste estudo está entre pH 4 e 5.

Titulação do sítio ativo com pepstatina A

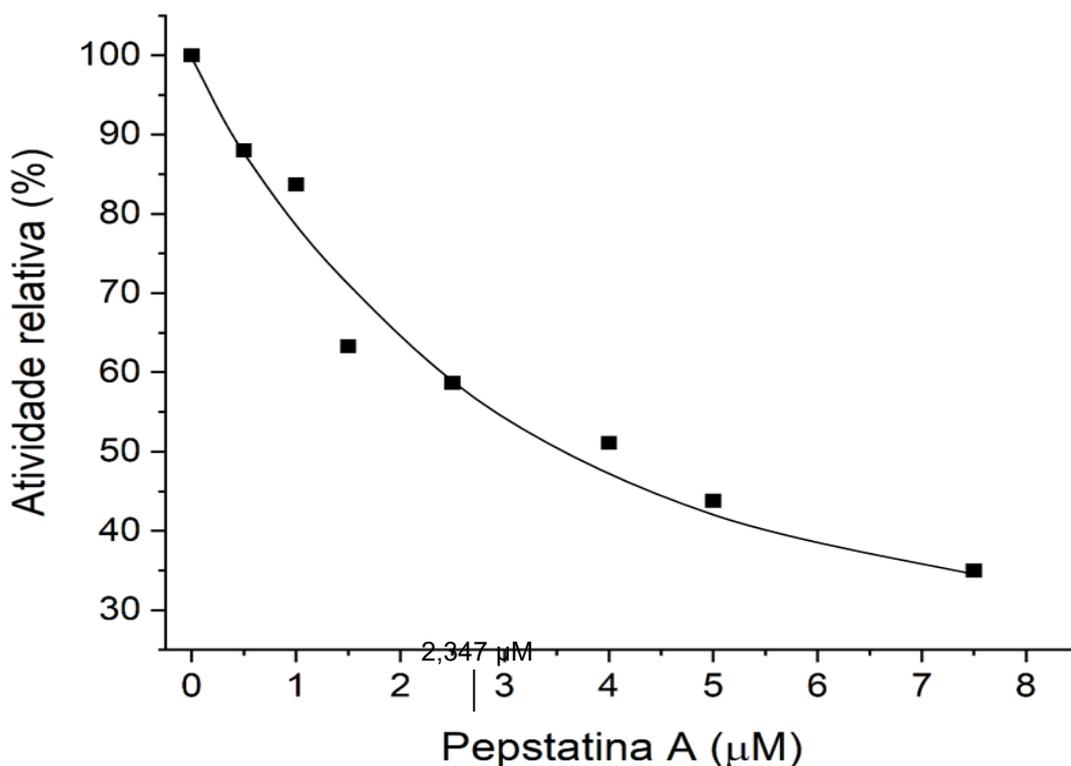


Figura 6. Titulação com pepstatina A para inibição da aspartil peptidase do fluido pericárdico humano. Foram feitas incubações com o inibidor nas concentrações de $1,5 \times 10^{-7}$ mol/L a $7,4 \times 10^{-6}$ mol/L, utilizando um volume constante da enzima e substrato em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,5. A atividade enzimática foi dada pela variação de fluorescência por unidade de tempo. A inibição foi feita utilizando um único substrato. Após a titulação do sítio ativo com pepstatina A, foi observado que a concentração da enzima ativa era de 2,347 μ M.

Determinação dos parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para a hidrólise dos substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina

Os parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M foram determinados para cada um dos substratos e demonstrados na **Tabela 2**.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para a hidrólise dos substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase isolada do fluido pericárdico humano.

Enzima	Sequência do Abz-peptídeo-Eddnp	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$)
Peptidase aspártica do fluido pericárdico	AIKFFSRQ	3,571	1,17	0,33
	AIAFFSRQ	0,981	5,45	5,56
	AILFFSRQ	1,755	6,18	3,52
	AISFFSRQ	1,053	4,34	4,12

A: Ala, alanina; F: Phe, fenilalanina; I: Ile, isoleucina; K: Lys, lisina; L: Leu, leucina; Q: Gln, glutamina; R: Arg, arginina; S: Ser, serina.

Os dados aqui apresentados foram utilizados para um estudo comparativo com dados observados para outras aspartil peptidases humanas utilizando o mesmo conjunto de substratos obtidos nas mesmas condições de ensaio demonstrados na **Tabela 3**.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M para a hidrólise dos substratos sintéticos relacionados à sequência do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase isolada do fluido pericárdico humano e de peptidases aspárticas humanas isoladas de outras fontes.

Enzima	Sequência do Abz-peptídeo-Eddnp	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$)
Peptidase aspártica do fluido pericárdico	AIKFFSRQ	3,571	1,17	0,33
	AIAFFSRQ	0,981	5,45	5,56
	AILFFSRQ	1,755	6,18	3,52
	AISFFSRQ	1,053	4,34	4,12
Catepsina D²⁸	AIKFFSRQ	0,600	4,36	7,27
	AIAFFSRQ	0,487	5,05	10,37
	AILFFSRQ	1,180	3,04	2,58
	AISFFSRQ	1,070	8,32	7,77
Gastricsina²⁸	AIKFFSRQ	0,650	12,72	19,57
	AIAFFSRQ	0,568	5,89	13,38

	AILFFSRQ	0,700	1,62	5,37
	AISFFSRQ	0,648	6,33	8,76
Pepsina ²⁸	AIKFFSRQ	0,986	12,82	13,00
	AIAFFSRQ	0,698	5,89	8,44
	AILFFSRQ	0,540	1,62	3,00
	AISFFSRQ	1,220	6,33	5,19
Uropepsina ²⁸	AIKFFSRQ	0,717	4,77	6,65
	AIAFFSRQ	0,597	3,18	5,33
	AILFFSRQ	0,730	1,97	2,70
	AISFFSRQ	0,575	2,58	4,49
Catepsina D ²⁶	AIKFFSRQ	1,20	4,88	4,07
	AIAFFSRQ	0,27	16,25	60,18
	AILFFSRQ	0,19	7,80	41,05
	AISFFSRQ	0,32	8,78	27,43

A: Ala, alanina; F: Phe, fenilalanina; I: Ile, isoleucina; K: Lys, lisina; L: Leu, leucina; Q: Gln, glutamina; R: Arg, arginina; S: Ser, serina.

DISCUSSÃO

Este trabalho mostra que o fluido pericárdico humano contém atividade de aspartil peptidase, inibida por pepstatina A, que foi isolada após etapas de purificação por cromatografias em resina de Cibacron Blue Agarose® para retirar a albumina (presente em grande quantidade nesse fluido), troca iônica em resina Q-Sepharose® e filtração molecular em coluna de resina Superose® 12 HR (Pharmacia). A enzima isolada apresentou uma massa molecular aparente de 141 kDa. A atividade de aspartil peptidase foi observada apenas nessa região de massa molecular. Quando analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições não-redutoras foi observado uma banda proteica com massa molecular aparente bastante superior a 65 kDa (padrão usado no procedimento) corroborando o dado obtido pela filtração molecular. Foi pressuposto que nessa condição cromatográfica a proteína se encontrava na forma nativa globular, visto que a atividade enzimática estava presente na

amostra eluída. O tratamento da enzima do fluido pericárdico com β -mercaptoetanol fez com que a banda proteica não pudesse mais ser visualizada na mesma região de massa molecular, sugerindo que a proteína nativa poderia estar na forma de dímero, ou ainda ligada a algum carreador presente no fluido pericárdico, o que necessita de mais experimentos para averiguação dessa possibilidade. A aspartil peptidase presente no fluido pericárdico humano foi detectada e monitorada por meio de um protocolo de purificação pela hidrólise do substrato Abz-KPIEFFRLQ-Eddnp, sequência clássica suscetível à hidrólise por aspartil peptidases.⁶ Sabemos que a hidrólise ocorre entre as ligações Phe-Phe, em pH ácido.²⁸ Substratos baseados na sequência do sítio reativo da calistatina usados em estudos de especificidade da catepsina D, foram hidrolisados na ligação Phe-Phe também, apesar da presença de Lys e Ser nas posições P₂ e P₂' da sequência do sítio reativo da calistatina desfavorecerem a ação enzimática da catepsina D.²⁵ Em um estudo foi observado que a hidrólise de substratos com apagamento intramolecular de fluorescência contendo Lys e Ser nas posições P₂ e P₂' na sequência do sítio reativo da calistatina.²⁷ A aspartil peptidase presente no fluido pericárdico humano, isolada neste trabalho foi avaliada quanto às propriedades catalíticas utilizando substratos com modificações na posição P₂ em torno do sítio reativo da calistatina (Abz-AIKFFSRQ-Eddnp, Abz-AIAFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp). Foi observado que à semelhança de outras aspartil peptidases a enzima do fluido pericárdico hidrolisou a ligação entre os resíduos de fenilalanina em todos os substratos utilizados (dados não mostrados). Esse comportamento permitiu comparar as propriedades catalíticas desta aspartil peptidase quando apenas o resíduo na posição P₂ é substituído. Foi observado que a presença do resíduo Lys na posição P₂ foi a modificação que mais interferiu na capacidade catalítica da enzima k_{cat}/K_M , se comparado aos resíduos Leu, Ala e Ser nesta posição. A presença de um aminoácido carregado em P₂ (Tabela 2) reduziu tanto a afinidade da enzima pelo substrato (K_M) quanto a constante catalítica (k_{cat}). Estes dados são similares àqueles observados por pimenta²⁶, que utilizando os mesmos substratos usados neste estudo e catepsina D de fígado humano, mostraram que Lys na posição P₂ foi a modificação mais crítica para a hidrólise pela catepsina D, onde tanto a afinidade pelo substrato (K_M), quanto a constante catalítica (k_{cat}) contribuíram para a menor eficiência catalítica (Tabela 3). Entretanto, estudos com este mesmo grupo de substratos (Abz-AIKFFSRQ-Eddnp, Abz-AIAFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp, Abz-AILFFSRQ-Eddnp), com pepsina, gastricsina, uropepsina e catepsina D de baço humanas mostraram que a substituição pelo resíduo Leu na posição P₂ foi a modificação que mais interferiu na capacidade hidrolítica, apesar deste grupo reunir enzimas secretórias e parenquimatosas.²⁸ Contrariamente ao observado para a enzima do fluido pericárdico e por

Pimenta²⁶, a catepsina D de baço usada em um estudo por Pereira²⁸, mostrou que Lys, Ala ou Ser em P₂ não são modificações críticas para a atividade catalítica. Vale ressaltar que foram utilizadas as mesmas condições para hidrólise em neste trabalho.²⁸ Neste contexto, se pode inferir que a isoforma pericárdica de aspartil peptidase apresenta maior semelhança com a catepsina D hepática usada por Pimenta²⁶ que a isoforma isolada e caracterizada de baço por Pereira²⁸. Estes dados são importantes por mostrar que as aspartil peptidases, nas suas isoformas, apesar de tantas similaridades estruturais, apresentam comportamentos distintos em relação às suas propriedades hidrolíticas. Estudos estruturais, como modelagem molecular da enzima frente aos substratos usados serão de grande valia no que se refere às interações no sítio ativo dessa isoforma. Ainda não há referências à presença de calistatina ou de um possível papel na inibição da calicreína no fluido pericárdico, mas dados anteriores para o fluido pericárdico humano²¹ já haviam mostrado a existência de uma atividade de serino peptidase relacionada à hidrólise de sequências sintéticas do cininogênio com características similares às calicreínas. Dados obtidos em um estudo³², mostram que a KLK11 promove a hipertrofia de cardiomiócitos por ativação de AKT-mTOR sinalizando para a promoção da síntese proteica e que a repressão de mTOR bloqueia os papéis de KLK11 na regulação da hipertrofia do cardiomiócito. Concluindo, se pode inferir que como o fluido pericárdico é um ultrafiltrado do plasma a partir do miocárdio, é pouco provável que a isoforma de aspartil peptidase aqui isolada a partir desse fluido tenha uma origem plasmática, visto que o processo de difusão é limitado a moléculas com massa moleculares inferiores a 40 kDa. A hidrólise da calistatina pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano sugere um potencial papel parácrino da enzima no equilíbrio da relação calicreína-calistatina no espaço pericárdico.

CONCLUSÕES

Uma peptidase que atua em pH ácido presente no fluido pericárdico humano foi purificada através das etapas cromatográficas de troca iônica e filtração molecular. A enzima foi inibida por pepstatina A, confirmando ser uma aspartil peptidase. A massa molecular aparente da enzima foi estimada em 141 kDa, por cromatografia de filtração em gel. A hidrólise de substratos com modificações na posição P₂ em torno do sítio reativo da calistatina mostrou que a presença do resíduo Lys em P₂ foi a modificação mais deletéria para a atividade enzimática, tanto para a afinidade da enzima pelo substrato (K_M) quanto para a constante catalítica (k_{cat}). A isoforma pericárdica de aspartil peptidase apresenta maior semelhança catalítica com a catepsina D hepática quando comparada à enzima isolada de baço. A hidrólise de sequências

do sítio reativo da calistatina pela aspartil peptidase do fluido pericárdico humano sugere que a enzima pode interferir em processos fisiológicos onde a calistatina esteja envolvida.

REFERÊNCIAS

1. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J.* 2004 Mar 15;378(Pt 3):705-16.
2. Tang J, Wong RN. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem.* 1987 Jan; 33(1):53-63.
3. Marciniyszyn J Jr, Hartsuck JA, Tang J. Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *J Biol Chem.* 1976 Nov 25;251(22):7088-94.
4. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967 Apr 20;27(2):157-62.
5. Powers JC, Harley AD, Myers DV. Subsite specificity of porcine pepsin. *Adv Exp Med Biol.* 1977; 95:141-57.
6. Dunn BM, Scarborough PE, Lowther WT, Rao-Naik C. Comparison of the active site specificity of the aspartic proteinases based on a systematic series of peptide substrates. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 362:1-9.
7. Schales O. Preparation and properties of rennin. *Journal of American Chemical Society.* 1942;(64):561-64.
8. Kay J, Dunn BM. Viral proteinases: weakness in strength. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Jan 30;1048(1):1-18.
9. Tanaka Y, Mine K, Nakai Y, Mishima N, Nakagawa T. Serum pepsinogen I concentrations in peptic ulcer patients in relation to ulcer location and stage. *Gut.* 1991 Aug.

10. Capony F, Rougeot C, Montcourrier P, Cavailles V, Salazar G, Rochefort H. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res.* 1989 Jul; 15:49(14):3904-9.
11. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, Freiss G, Christensen IJ, Khalaf S, Paolucci F, Pau B, Rasmussen BB, Rose C. Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res.* 1989 Nov 1;49(21):6008-14.
12. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med.* 1990 Feb 1; 322(5):297-302.
13. Hial V, Keiser HR, Pisano JJ. Origin and content of methionyl-lysyl-bradykinin, lysyl-bradykinin and bradykinin in human urine. *Biochem Pharmacol.* 1976 Nov; 15:25(22):2499-503.
14. Gomes RAS, Chagas JR, Juliano L, Hial V. Met-Lys-bradykinin-Ser, the kinin released from human kininogen by human pepsin. *Immunopharmacology.* 1996 May; 32(1-3):76-9.
15. Gomes RAS, Juliano L, Chagas JR, Hial V. Characterization of kininogenase activity of an acidic proteinase isolated from human kidney. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997 Jun; 75(6):757-61.
16. Kaplan AP, Joseph K, Silverberg M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol, USA*, v.2, p.195-209, 2002.
17. 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 Sci.* 1975 Aug 15;17(4):613-8.
18. Gomes RAS, Teodoro LDGVL, Lopes IC, Bersanetti PA, Carmona AK, Hial V. Angiotensin-converting enzyme in pericardial fluid: comparative study with serum activity. *Arq Bras Cardiol.* 2008 Sep; 91(3):156-61, 172-8.

19. Vieira ML, Cury AF, Gustavo N, Oliveira WA, Monaco CG, Cordovil A, Rodrigues AC, Lira Filho EB, Fischer CH, Morhy SS. Ventricular dyssynchrony index: comparison with two-dimensional and three-dimensional ejection fraction. *Arq Bras Cardiol.* 2008 Sep; 91(3):142-7, 156-62.
20. Filho IRS, Pereira ICC, Morais LJ, Teodoro LDGVL, Rodrigues MLP, Gomes RADS. Pericardial Parietal Mesothelial Cells: Source of the Angiotensin-Converting-Enzyme of the Bovine Pericardial Fluid. *Arq Bras Cardiol.* 2017 Nov; 109(5):425-431.
21. Del Ciello G, Gomes RAS, Teodoro LGVL, Ferreira HM, Juliano MA, Hial V. Caracterização da atividade cininogénica no líquido pericárdico humano. *Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade Federal do Triângulo Mineiro* 2015 Set.
22. Chao J, Chai KX, Chao L. Tissue kallikrein inhibitors in mammals. *Immunopharmacology.* 1996 May; 32(1-3):67-72.
23. Zhou GX, Chao L, Chao J. Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *J Biol Chem.* 1992 Dec 25;267(36):25873-80.
24. Pohl J, Dunn BM. Secondary enzyme-substrate interactions: kinetic evidence for ionic interactions between substrate side chains and the pepsin active site. *Biochemistry.* 1988 Jun 28;27(13):4827-34.
25. Scarborough PE, Guruprasad K, Topham C, Richo GR, Conner GE, Blundell TL, Dunn BM. Exploration of subsite binding specificity of human cathepsin D through kinetics and rule-based molecular modeling. *Protein Sci.* 1993 Feb; 2(2):264-76.
26. Pimenta DC, Oliveira A, Juliano MA, Juliano L. Substrate specificity of human cathepsin D using internally quenched fluorescent peptides derived from reactive site loop of kallistatin. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Jan 12;1544(1-2):113-22.
27. Pimenta DC, Chen VC, Chao J, Juliano MA, Juliano L. α_1 -Antichymotrypsin and kallistatin hydrolysis by human cathepsin D. *Journal of Protein Chemistry*, v.19, p. 411-418. 2000.

28. Pereira ICC, Gomes RAS, Teodoro LGVL. Atividade da catepsina D, gastricsina, pepsina e uropepsina humanas sobre substratos sintéticos relacionados à calistatina humana. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade Federal do Triângulo Mineiro 2009 Set.
29. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, p. 265-75, 1951.
30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
31. Burbach JPH., Prins A, Lebouille JL, Verhoef J, Witter A. Sensitive and rapid amino acid analysis of peptide hydrolysates by high-performance liquid chromatography of o-phthaldialdehyde derivatives. *Journal of Chromatography A* 237 1982 Mar; 339-343.
32. Wang Y, Liao H, Wang Y*, Zhou J, Wang F, Xie Y, Zhao K and Gao W. BMC Cardiovasc Disord - KLK11 promotes the activation of mTOR and protein synthesis to facilitate cardiac hypertrophy. 2021 21:266.