



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

LUDOVICO MIGLIOLO

**Construção de modelos de interação *in silico* e *in vitro* do
inibidor do tipo Kunitz de *Adenantha pavonina* L.
para as enzimas cisteínicas e serínicas**

**Natal/RN
2008**

LUDOVICO MIGLIOLO

**Construção de modelos de interação *in silico* e *in vitro* do
inibidor do tipo Kunitz de *Adenantha pavonina* L.
para as enzimas cisteínicas e serínicas**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Maurício Pereira de Sales.

**Natal/RN
2008**

Divisão de Serviços Técnicos
Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial Leopoldo
Nelson.

Migliolo, Ludovico.

Construção de modelos de interação *in silico* e *in vitro* do inibidor do tipo Kunitz de *Adenathera pavonina* L. para as enzimas cisteínas e serínicas / Ludovico Migliolo. - Natal(RN), 2008.

95 f.

Orientador: Maurício Pereira de Sales.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Inibidor de proteinases - Dissertação. 2. *Adenathera pavonina* - Inibidor Bifuncional - Dissertação. 3. Enzimas – Proteinases serínica e cisteínica - Dissertação. 4. Modelagem Comparativa – estudos de interação - Dissertação. I. Sales, Maurício Pereira de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BC

CDU 577.112 (043.3)

LUDOVICO MIGLIOLO

Construção de modelos de interação *in silico* e *in vitro* do inibidor do tipo Kunitz de *Adenantha pavonina* L. para as enzimas cisteínicas e serínicas

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Dr. Mauricio Pereira de Sales
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientador

Prof. Octavio Luiz Franco
Departamento de Bioquímica – UFPE
1º Examinador

Prof. João Paulo Matos Santos Lima
Departamento de Bioquímica – UFRN
2º Examinador

Dedico esta obra

A todas as pessoas que participaram de maneira direta e indireta dessa conquista, mas principalmente a algumas que foram e são bastante especiais e que considero muito importante para que esse trabalho tenha sido um sonho realizado.

Professor Doutor Maurício Pereira de Sales, Doutora Adeliana Oliveira e Professor Doutor Elizeu Antunes dos Santos pelos tempos dedicados ao meu aprender.

Dedico também as não menos importantes pessoas que me apoiaram indiretamente; à minha família incluindo a mais nova integrante Renata Bezerra Duarte (TAAA) e a Dona Lúcia (mãe da Renata).

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço sinceramente a todas as pessoas do laboratório de bioquímica e função de proteínas bioativas - LQFPB. Principalmente ao Professor Doutor Maurício Pereira de Sales, Doutora Adeliana Silva de Oliveira e Professor Doutor Elizeu Antunes dos Santos.

Agradeço eternamente a Maurício Pereira de Sales a paciência e a persistência em sempre mostrar o caminho. A Elizeu Antunes dos Santos sendo uma pessoa muito inteligente, tranqüila e prática. A mulher mais inspiradora cientificamente que já conheci, Adê, uma grande mulher no tamanho e também na garra.

Gostaria de agradecer as duas pessoas que mais investiram esses últimos anos no meu aprendizado chamados Elizabete Luzia Fioravante (minha mãe) e Eugênio Carlos Lavra (meu pai), amo demais esses veios. A também minha grande (Sophia Migliolo) e pequena (Liss Fioravante Lavra) irmãs que amo muito.

Gostaria de agradecer de modo muito especial à pessoa que amo demais Renata Bezerra Duarte (minha noiva) a qual me deu muito apoio e principalmente me escutou muito nessa jornada, muito obrigado por estar em minha vida. A minha sogra que também amo muito (quando esta durmindo) por ter criado tão bem sua filha e por ter aprendido a fazer ótimas comidas, principalmente o PIRÃO (ai gosto dela acordada).

Gostaria de agradecer ao amigo Rodrigo Oliveira de Aquino um grande irmão e companheiro em vários momentos que mesmo um pouco distante por motivos pessoais meus andamos por muito tempo lado a lado.

Aos alunos de iniciação científica brasileiros Dayse, Hugo, Janison, Thales, Ibson que continuam atrás de suas conquistas e a aluna de iniciação científica gringa Sofia.

Aos novos alunos de iniciação científica Rafael (Russo), Tafarel, Daniele e aos mais novos Anderson (Negão) e Aline pelos momentos em reunião e risadas.

Aos companheiros da turma de mestrado Sérgio, Virginia, Daniela, Micheline, Ana Celly, Adriana, Lissandra, Videany, Pablo, Rodrigo e Juliana pelas boas horas de estudo, risadas e muito entusiasmo em nossas jornadas de leitura de artigos e o cumprimento das disciplinas da educação e de bioestatística.

A todos os mestrandos que passaram pelo Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (Fabiano, Kátia, Leonardo, Ticiano, Gioconda, Daniele) e aos que ainda lá residem (Norberto, Sheila, Rodrigo e Cleysyvan).

Aos professores Adriana Uchôa, Kátia Scortecci, Alexandre Queiroz e Umberto que participaram da minha banca examinadora de pré e qualificação e foram de grande importância na construção desse sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Banco do Nordeste (BNB) e Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDECI) que contribuíram com recursos financeiros para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

***"NENHUMA BATALHA JAMAIS FOI GANHA SEM O PODER DO
ENTUSIASMO".***

(JOHN LORD O BRIAN)

RESUMO

Os inibidores de proteinases serínicas (IPs) estão extensamente distribuídos na natureza e inibem a atividade enzimática *in vitro* e *in vivo*. Estes IPs em sementes de leguminosas compreendem sete famílias, no entanto as famílias Bowman-Birk e do tipo Kunitz são as mais estudadas e representam um papel importante na primeira linha de defesa contra insetos pragas. Alguns inibidores do tipo Kunitz possuem atividades para proteinases serínicas e cisteínicas sendo denominados inibidores bifuncionais, como o inibidor ApTKI da semente de *Adenantha pavonina*. O inibidor de *A. pavonina* por apresentar essa característica incomum aos inibidores dessa família foi utilizado para o estudo da interação entre as proteinases serínica (tripsina) e cisteínica (papaína). Para determinar a interação *in vitro* de ApTKI e as enzimas alvo foi realizada a purificação do inibidor a partir de técnicas cromatográficas e ensaios de inibição. O modelo 3D do inibidor bifuncional ApTKI foi construído pelo programa SWISS-MODEL através da metodologia de modelagem por homologia utilizando como molde o inibidor de tripsina de soja (STI, pdb:1ba7) que apresentou 40% de identidade com a proteína alvo. A qualidade do modelo foi avaliada pelo programa PROCHECK. Para a análise do complexo *in silico* entre as enzimas alvo e o inibidor foi utilizado o programa HEX 4.5. Estes resultados confirmaram os ensaios inibitórios *in vitro*, onde ApTKI apresentou a capacidade de inibir simultaneamente tripsina e papaína. Algumas das diferenças observadas nos resíduos do sitio reativo explicam a forte afinidade para tripsina e a fraca para papaína.

Palavras Chaves: *Adenantha pavonina*; inibidor bifuncional; modelagem comparativa; estudos de interação.

ABSTRACT

Serines proteinases inhibitors (PIs) are widely distributed in nature and are able to inhibit both *in vitro* and *in vivo* enzymatic activities. Seed PIs in than leguminous are classified in seven families, Bowman-Birk and Kunitz type families that most studied representing an important role in the first line of defense toward insects pests. Some Kunitz type inhibitors possess activities serine and cysteine for proteinases named bifunctional inhibitor, as ApTKI the inhibitor isolate from seed of *Adenantha pavonina*. The *A. pavonina* inhibitor presenting the uncommon property and was used for interaction studies between proteinases serine (trypsin) and cysteine (papain). In order to determinate the *in vitro* interaction of ApTKI against enzymes inhibitor purification was carried cut by using chromatographic techniques and inhibition assays. The 3D model of the bifunctional inhibitor ApTKI was constructed SWISS-MODEL program by homology modeling using soybean trypsin inhibitor (STI, pdb:1ba7), as template which presented 40% of identity to *A. pavonina* inhibitor. Model quality was evaluated by PROCHECK program. Moreover *in silico* analyzes of formed complex between the enzymes and ApTKI was evaluated by HEX 4.5 program. *In vitro* results confirmed the inhibitory assays, where the inhibitor presented the ability to simultaneously inhibit trypsin and papain. The residues encountered in the inhibitor model of folder structural three-dimensional that make contact to enzymes target could explain the specificity pattern against serine and cysteine proteinases.

Keywords: *Adenantha pavonina*; bifunctional inhibitor; homology modeling; docking study.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama modificado do modelo do domínio ancestral que sofreu sucessivos eventos genéticos até a conformação final β -folha proposto por Murkhopadhyay (1999), em que os IPs do tipo Kunitz se originaram de um domínio ancestral. 26
- Figura 2.** Estrutura do inibidor tipo Kunitz de *Delonix regia*. 27
- Figura 3.** (a) Sobreposição estrutural do esqueleto das alças de ligação dos inibidores tipo Kunitz, *Glycine max* em azul, *Delonix regia* em vermelho, *Erythrina caffra* em amarelo, *Copaifera langsdorffii* em ciano, *Psophocarpus tetragonolobus* (WBA) em preto, *Hordeum vulgare* em salmom e *Psophocarpus tetragonolobus* (WCI) em verde. 28
- Figura 4.** Foto ilustrativa da leguminosa da subfamília Mimosoideae *Adenantha pavonina*. 32
- Figura 5.** Alinhamento múltiplo da seqüência dos inibidores tipo Kunitz em leguminosas. Os três grupos taxonômicos Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae estão representados em “m”, “c” e “p”, respectivamente. 42
- Figura 6.** Alinhamento da seqüência primária dos inibidores tipo Kunitz da subfamília Mimosoideae. 43
- Figura 7.** Alinhamento da seqüência primária dos inibidores tipo Kunitz da subfamília Caesalpinoideae. 44
- Figura 8.** Alinhamento da seqüência primária dos inibidores tipo Kunitz da subfamília Papilionoideae. 45
- Figura 9.** Árvore filogenética não enraizada construída relacionando o inibidor de *Adenantha pavonina* com as três classes de especificidade. 48

Figura 10. Alinhamento entre as seqüências primárias dos inibidores bifuncionais de <i>Adenantha pavonina</i> e <i>Prosopis juliflora</i>	49
Figura 11. Perfil cromatografico da fração F2 em gel filtração S100.	52
Figura 12. (A) Perfil cromatográfico da amostra F2-3 aplicada no sistema de purificação ÄKTA. (B) Curva de calibração de molecular para o inibidor ApTKI.	53
Figura 13. Curva de titulação do inibidor ApTKI.	55
Figura 14. Alinhamento entre as seqüências dos inibidores do tipo Kunitz ApTKI e o molde 1ba7.	58
Figura 15. Mapa de Ramachandran, no qual estão mostradas as regiões fisicamente permitidas para os aminoácidos do modelo ApTKI.	60
Figura 16. Resumo dos dados estatística dos resíduos de aminoácidos situados no mapa de Ramachandran.	61
Figura 17. Análise dos diferentes parâmetros de fatores G do modelo ApTKI.	61
Figura 18. Conjunto de gráficos mostrando o comportamento da estrutura ApTKI comparado a estruturas bem refinadas em resolução similar (no caso 2.0Å), para a cadeia principal (A) e lateral (B).	62 e 63
Figura 19. Sobreposição estrutural do modelo ApTKI (azul) com a estrutura experimental do inibidor de soja - 1ba7 (rosa).	64
Figura 20. Modelo do inibidor tipo Kunitz de <i>A. pavonina</i> construído com o programa SWISS-MODEL.	65
Figura 21. Visão geral da interação entre o modelo do inibidor ApTKI (marrom) e a tripsina (azul), destacando a alça reativa (verde) e os resíduos de aminoácido da enzima (vermelho).	68

Figura 22. Visualização da formação do complexo entre o inibidor ApTKI (marrom) e a proteinase serínica tripsina (azul).	69
Figura 23. Visão geral da interação entre o modelo do inibidor ApTKI (marrom) e a papaína (rosa), destacando os resíduos do inibidor (verde) que interagem com os resíduos da enzima (vermelho).	71
Figura 24. Visualização da formação do complexo entre o inibidor ApTKI (marrom) e a proteinase cisteínica papaína (rosa).	72
Figura 25. Visualização geral da formação do complexo ternário entre o inibidor Papaína–ApTKI–Tripsina. Papaína (rosa), ApTKI (marrom) e tripsina (azul).	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição botânica e especificidade de alguns exemplos de inibidores de proteinases.	22
Tabela 2. Família de inibidores de proteinases de plantas.	24
Tabela 3. Inibidores bifuncionais.	30
Tabela 4. Classificação dos inibidores de proteinase do tipo Kunitz de acordo com o domínio STI encontrado no inibidor da semente de soja.	47
Tabela 5. Comparação dos resíduos do sitio ativo do inibidor para tripsina (resíduo na posição 64) e papaína (resíduos nas posições 60, 89, 109) de <i>P. juliflora</i> com os demais integrantes da subfamília Mimosoideae.	51
Tabela 6. Inibição da tripsina e papaína por ApTKI, ApTKI pré-incubada com ambas enzimas e atividade proteolítica das proteinases serínica e cisteínica.	56
Tabela 7. Distribuição da estrutura secundária de ApTKI.	66

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS/ EXPRESSÕES

3D – Tridimensional.

Docking – Um método utilizado para detectar sítios de ligação em proteína e avaliar interações proteína-proteína ou proteína-ligante, utilizando para cálculo a energia livre de ligação entre as moléculas. É dividido em docking rígido e flexível.

PDB – (Protein Data Bank) É uma coleção de estruturas 3D de proteínas determinadas principalmente por cristalografia de raios X ou ressonância magnética nuclear. É acessível em <http://www.rcsb.gov/pdb>.

RMSD – (*Root Mean Square Deviation*) Mede a diferença estrutural entre duas estruturas sobrepostas.

Restrições estereoquímica – Estas restrições espaciais estão implicadas pela topologia covalente da molécula. Elas incluem restrições sobre os comprimentos de ligação, ângulos diedros, ângulos de ligação, planaridade de anéis e quiralidade de centros quirais.

Fator G – Medida de quão “normal” ou de quão “incomum” está a estrutura tridimensional em estudo.

RMN – Ressonância Magnética Nuclear.

Seqüência Alvo – Seqüência primária de proteína utilizada na modelagem para determinação de sua estrutura.

Swiss-Prot – Banco de dados de seqüências primárias.

Template – Estrutura resolvida experimentalmente presente no PDB utilizada como molde na modelagem comparativa.

Bootstrap – é um método estatístico de re-amostragem com reposição pseudoaleatória dos dados. O número de dados amostrados mantém-se constante.

Árvore Filogenética não enraizada – explica relações de topologia, só não especifica a ancestralidade do grupo em estudo.

Método de Máxima Parcimônia – hipótese mais simples que identifica a árvore que apresenta o menor número de etapas ou passos para explicar os dados.

PjTKI – *Prosopis juliflora*.

AcTKI – *Acacia confusa*.

ApTKI – *Adenantha pavonina*.
LITKI – *Leucaena leucocephala*.
EcTKI – *Enterolobium contortisiliquum*.
DrTKI – *Delonix regia*.
EvTKI – *Erythrina variegata*.
EITKI – *Erythrina latissima*.
EcTKI – *Erythrina caffra*.
BrTKI – *Bauhinia ruffa*.
BbTKI – *Bauhinia bauhinioides*.
CaTKI – *Cicer arietinum*.
GmTKI – *Glycine max*.
MtTKI – *Medicago truncatula*.
PtTKI – *Psophocarpus tetragonolobus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Aspectos Gerais	19
1.2 Inibidores de proteinases como uma defesa das plantas	19
1.3 Distribuição botânica dos inibidores tipo Kunitz	21
1.4 Classificação de inibidores de proteinases de plantas	24
1.5 Inibidores da Família Kunitz	25
1.6 Filogenia dos inibidores de proteinase do tipo Kunitz de leguminosas	26
1.7 Estrutura dos Inibidores de proteinases do Tipo Kunitz	2
1.8 Mecanismo de inibição dos Inibidores de proteinases do Tipo Kunitz	28
1.9 Inibidores de proteinase bifuncionais	29
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Sementes	32
3.1.1 Reagentes	32
3.1.2 Equipamentos	33
3.1.3 Programas	33
3.2 Filogenia	34
3.3 Modelo de interação Enzima-Inibidor	35
3.3.1 Preparo da farinha de <i>Adenanthera pavonina</i>	35
3.3.2 Preparo do extrato bruto da farinha	35
3.3.3 Fracionamento com sulfato de amônia	35

3.3.4 Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S100	36
3.3.5 Determinação das concentrações proteicas	36
3.3.6 Determinação da atividade antitriptica	36
3.3.7 Determinação da atividade antipapainásica	37
3.3.8 Análise da interação enzima-inibidor por cinética enzimática	37
3.3.9 Modelagem do inibidor ApTKI	38
a) Identificação e seleção de proteínas-molde	38
b) Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos	38
c) Construção do modelo	39
d) Validação do modelo	38
3.3.10 Acoplamento do Inibidor Kunitz em complexo com Tripsina e com Papaína	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Filogenia	41
4.1.1 Análise da seqüência primária dos IPs tipo Kunitz de leguminosas e Distribuição filogenética	41
4.1.2 Análise da seqüência primária dos IPs do tipo Kunitz em Mimosoideae	50
4.2 Modelo de interação <i>in vitro</i> de ApTKI para as enzimas tripsina e papaína	51
4.2.1 Purificação de ApTKI	51
4.2.2 Relação equimolar de ApTKI para as enzimas papaína e tripsina	54
4.2.3 Padrões de interação <i>in vitro</i> ApTKI-Tripsina e ApTKI-Papaína	56
4.3 Modelo de interação <i>in silico</i> de ApTKI para as enzimas tripsina e papaína	57
4.3.1 Modelagem de ApTKI	57
a) Seleção do molde	57

b) Alinhamento das seqüências de ApTKI e o inibidor de tripsina de soja (1ba7)	57
c) Avaliação do modelo 3D de ApTKI	58
4.3.2. Modelo de ApTKI	65
4.3.3 Padrão de interação <i>in silico</i> ApTKI-Tripsina	67
4.3.4 Geometria do sitio reativo do complexo <i>in silico</i> ApTKI-Tripsina	67
4.3.5 Padrão de interação <i>in silico</i> ApTKI-papaína	70
4.3.6 Geometria do sítio reativo do complexo <i>in silico</i> ApTKI-Papaína	70
4.3.7 Formação do complexo ternário	73
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O isolamento e a caracterização de genes e produtos gênicos presentes em plantas é uma das vertentes de grande destaque na pesquisa biotecnológica. Proteínas vegetais, como as enzimas, lectinas, arcelinas, vicilinas, proteínas inativadoras de ribossomos e inibidores de enzimas estão envolvidas em vários processos biológicos, incluindo sua ação como proteínas de reserva, de reguladores endógenos e de defesa das plantas. Esta última característica é a mais estudada, devido ao seu emprego como ferramenta biotecnológica para deter a herbivoria excessiva de insetos pragas e patógenos (XAVIER-FILHO, 1992).

A busca por inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas, vem recebendo atenção especial na tentativa de elucidar questões relacionadas à estrutura, papel fisiológico, mecanismo de ação, evolução e principalmente o envolvimento nos mecanismos de defesa das plantas (NORIOKA, et al., 1987; BRZIN; KIDRIC, 1995; SONG; SUH, 1998; BODE; HUBER, 1992, 2000; KRAUCHENCO, et al., 2003, 2004; GOMES, et al., 2005a; ARAÚJO, et al., 2005a; BHATTACHARYYA, et al., 2006). Esses inibidores ligam-se especificamente a proteinases presentes no trato digestivo dos insetos, diminuindo a assimilação de nutrientes, causando retardo no desenvolvimento e aumento da taxa de mortalidade (FRANCO, et al., 2002; OLIVEIRA, et al., 2003; GOMES, et al., 2005). Portanto a purificação e caracterização de inibidores de proteinases presente em sementes, a determinação da especificidade de inibição e os estudos *in silico* dos inibidores são de grande importância para direcionar a indicação de proteínas inibidoras candidatas em estudos de transformação de plantas e como bioinseticidas (XAVIER-FILHO, 1992; SATTAR, et al., 2003; LOPES, et al., 2004).

1.2 INIBIDORES DE PROTEINASES COMO UMA DEFESA DAS PLANTAS

As plantas, ao longo da evolução, desenvolveram mecanismos de defesa contra o ataque de predadores. Estas defesas podem ser físicas e químicas. A defesa de natureza física pode ser representada pela presença de tegumentos resistentes, de

pêlos, espinhos e tricomas. A defesa química é dividida em defesa química não-protéica, que envolve compostos alcalóides, aminoácidos não protéicos e flavonóides. A defesa química protéica pode ser representada pela expressão de lectinas, inibidores de amilases e de proteinases. As defesas químicas protéicas podem ser ainda divididas em constitutivas, as quais são sintetizadas durante o desenvolvimento e formação da planta e induzidas, que são sintetizadas em resposta a estímulos bióticos ou abióticos (XAVIER-FILHO, 1992).

Os inibidores de proteinases (IP) são de ocorrência comum no Reino Plantae. Estes IPs em plantas são geralmente proteínas pequenas que têm sido principalmente descritas em tecidos de reserva, tal como tubérculos e sementes, mas são também encontrados em outras partes das plantas (DE LEO; GALLERANI, 2002). Em folhas, eles são induzidos em resposta a injúrias ou ataques de insetos ou patógenos (RYAN, 1990; BATISTA, et al., 1996; SHEWRY; LUCAS, 1997). Uma das importantes estratégias de defesa que são encontradas em plantas para combater predadores envolve estes IPs que são particularmente efetivos contra insetos fitófagos e microorganismos. A capacidade defensiva destes IPs em plantas é causada pela inibição das proteases presentes no intestino dos insetos ou secretada por microorganismos, resultando em uma redução na quantidade dos aminoácidos necessários para seu crescimento e desenvolvimento (LAWRENCE; KOUNDAL, 2002).

Os IPs encontrados em plantas são proteínas ou peptídeos que têm a capacidade de suprimir a atividade de enzimas proteolíticas endógenas, durante o desenvolvimento das sementes e também podem inibir a atividade de enzimas exógenas *in vitro* e *in vivo* formando complexos estáveis. Eles comportam-se como pseudosubstratos enzimáticos altamente específicos ao interagir em sítios particulares, conhecidos como sítio reativo (TSCHECHE, 1974; LASKOWSKI; KATO, 1980; RICHARDSON, 1991). As especificidades frente às enzimas proteolíticas variam consideravelmente, alguns inibem somente tripsina, outros têm atividade contra a tripsina e a quimotripsina e outros inibem proteinases diferentes, de origem vegetal como a papaína ou de origem microbiana (BELITZ; GROSH, 1997).

1.3 DISTRIBUIÇÃO BOTÂNICA DOS INIBIDORES TIPO KUNITZ

Os IPs ocorrem na natureza em vários grupos sistemáticos de plantas e diferem entre si por suas propriedades (TABELA 1). Os IPs são ubíquos, geralmente proteínas regulatórias pequenas presentes em concentrações de 5 à 15% das proteínas totais, e são encontrados em sementes de Fabaceae, Brassicaceae, Poaceae e tubérculos de Solanaceae (RYAN, 1981; BOLTER; JONGSMA, 1997; SCHULER, et al., 1998; ASCENZI, et al., 1999; OLIVA, et al., 2000).

Tabela 1. Distribuição botânica e especificidade de alguns exemplos de inibidores de proteinases.

Fonte	Família	Especificidade	Referência
<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	P	OJIMA, et al., 1997
<i>Colocasia esculenta</i>	Araceae	T, Q	OLIVEIRA, 2001
<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	P, F, CH, CB, CL	KOZUMA, et al., 1996
<i>Brassica juncea</i>	Brassicaceae	T	MANDAL, et al., 2002
<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	P, Qp, Car, PIV	SONG, et al., 1995
<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	T, Q	ODANI, et al., 1996
<i>Dianthus caryophyllus</i>	Caryophyllaceae	P	KIM, et al., 1999
<i>Curcubita maxima</i>	Curcubitaceae	P, F	LEVLEVA, et al., 1997
<i>Acacia confusa</i>	Fabaceae	T, Q	HUNG, et al., 1994
<i>Adenanthera pavonina</i>	Fabaceae	T, Q, P	MACEDO, et al., 2004
<i>Archidendron ellipticum</i>	Fabaceae	T, Q	BHATTACHARYYA, et al., 2006
<i>Bauhinia variegata</i>	Fabaceae	T	OLIVA, et al., 2001
<i>B. ruffa</i>	Fabaceae	E	SUMIKAWA, et al., 2006
<i>Caesalpinia bonduc</i>	Fabaceae	T, Q	BHATTACHARYYA, et al., 2007
<i>C. echinata</i>	Fabaceae	T	CRUZ-SILVA, et al., 2004
<i>Cassia obtusifolia</i>	Fabaceae	T	LIAO, et al., 2007
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Fabaceae	T	KRAUCHENCO, et al., 2004
<i>Crotalaria pallida</i>	Fabaceae	T, Q, E, P	GOMES, et al., 2005a
<i>Delonix regia</i>	Fabaceae	T	PANDO, et al., 2001
<i>Dimorphandra mollis</i>	Fabaceae	T	MACEDO, et al., 2000
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Fabaceae	T, Q	BATISTA, et al., 1996
<i>Erythrina variegata</i>	Fabaceae	T, Q	IWANAGA, et al., 2005
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	T, Q, P	KOIDE, et al., 1973; MISAKA, et al., 1996
<i>Hordeum vulgare</i>	Fabaceae	P, F, Qp	GADDOUR, et al., 2001
<i>Inga laurina</i>	Fabaceae	T	MACEDO, et al., 2007
<i>Leucaena leucocephala</i>	Fabaceae	T, Q	OLIVA, et al., 2000
<i>Peltophorum dubium</i>	Fabaceae	Q	MACEDO, et al., 2003

Fonte	Família	Especificidade	Referência
<i>Phaseolus lunatus</i>	Fabaceae	P, CH, CB, CL	BRZIN, et al., 1998
<i>Pithecellobium dulce</i>	Fabaceae	T	DELGADO-VARGAS, et al., 2006
<i>Pithecellobium dumosum</i>	Fabaceae	T, Q, P	OLIVEIRA, et al., 2007
<i>Prosopis juliflora</i>	Fabaceae	T, Q, P	OLIVEIRA, et al., 2002
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Fabaceae	Q	KORTT, 1980
<i>Schizolobium parahyba</i>	Fabaceae	Q, E	TELES, et al., 2004
<i>Swartzia pickelli</i>	Fabaceae	T, Q	CAVALCANTI, et al., 2002
<i>Tamarindus indica</i>	Fabaceae	T	ARAÚJO, et al., 2005a
<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	P	FERNANDES, et al., 1993
<i>Wisteria floribunda</i>	Fabaceae	P	HIRASHIKI, et al., 1990
<i>Castanea sativa</i>	Fagaceae	P, F, Qp, T	PERNAS, et al., 1998
<i>Oryza sativa</i>	Gramineae	P, CH, CB, CL	ABE, et al., 1987
<i>Pennisetum glaucum</i>	Gramineae	P	JOSHI, et al., 1998
<i>Zea mays</i>	Gramineae	P, CH, CB, CL	ABE, et al., 1992
<i>Persea americana</i>	Lauraceae	P	KIMURA, et al., 1995
<i>Artocarpus intergrifolia</i>	Moraceae	T, Q	BHAT, et al., 1989
<i>Chelidonium majus</i>	Papaveraceae	P, CH, CL	ROGELJ, et al., 1998
<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	P, F, CB	RYAN, et al., 1998
<i>Murraya koenigii</i>	Rutaceae	T	SHEE, et al., 2007
<i>Lycopersicon esculento</i>	Solanaceae	P	JACINTO, et al., 1998
<i>Solanum tuberosum</i>	Solanaceae	P, T, Q	WALDRON, et al., 1993; VALUEVA, et al., 1998

Legenda de especificidade: P, papaína; T, tripsina; Q, quimotripsina; F, ficina; CH, catepsina H; CB, catepsina B; CL, catepsina L; Qp, quimopapaína; Car, caricaína; PIV, protease de mamão; E, elastase.

1.4 CLASSIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASES DE PLANTAS

Os IPs em plantas têm sido agrupados dentro de famílias levando em consideração a classe de enzimas que inibem, a seqüência aminoacídica, a homologia estrutural e o sitio reativo (TABELA 2) (NEURATH, et al., 1996; KOIWA, et al., 1997; VALUEVA; MOSOLOV, 1999; DE LEO; GALLERANI, 2002; LASKOWSKI, et al., 2003; HABIB; FAZILLI, 2007).

Tabela 2. Família de inibidores de proteinases de plantas.

Proteinases	Classe	Família de Inibidores
Serínicas	Inibidores de proteinases serínicas	Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Superfamília de Cereais Taumatina Ragi I-2/milho
Cisteínicas	Inibidores de proteinases cisteínicas	Fitocistatinas (cistatina de planta)
Aspárticas	Inibidores de proteinases aspárticas	Inibidores de proteinases aspárticas
Metalo-proteinases	Inibidores de metalo-proteinases	Inibidores de carboxipeptidasas A e B

Os inibidores de proteinases serínicas em plantas são descritos em sete famílias, entretanto a família de inibidores tipo Kunitz é intensamente investigada em leguminosas (Fabacea).

1.5 INIBIDORES DA FAMÍLIA KUNITZ

A família dos inibidores de proteinases do tipo Kunitz é agrupada com relação à similaridade da seqüência primária, e por este motivo os inibidores formam uma família separada apresentando cerca de 180 resíduos de aminoácidos. Os inibidores do tipo Kunitz são amplamente distribuídos em plantas e são descritos em leguminosas, cereais e tubérculos (ISHIKAWA, et al., 1994; LASKOWSKI; KATO, 1980). Os inibidores tipo Kunitz geralmente tem massa molecular por volta de 18 a 26 KDa, tem duas pontes dissulfeto, apresentam uma ou duas cadeias polipeptídicas e um sitio reativo. Os membros desta família de inibidores são na maioria ativos contra proteinases serínicas como tripsina, quimotripsina, elastase e subtilisina (LAING; MCMANUS, 2002; HEIBGES, et al., 2003; GOMES, et al., 2005a; PARK, et al., 2005), mas eles também inibem outras classes de proteinases, incluindo as aspárticas como a catepsina D, catepsina L, as amilases de insetos e de plantas, e as cisteínicas como a papaína (KEILOVA; TOMASEK, 1976; RITONJA, et al., 1990; RODENBURG, et al., 1995; MACEDO, et al., 2004; OLIVEIRA, et al., 2002; GOMES, et al., 2005; OLIVEIRA, et al., 2007).

1.6 FILOGENIA DOS INIBIDORES DE PROTEINASE DO TIPO KUNITZ DE LEGUMINOSAS

A diversidade biológica, ou seja, as diferenças entre os grupos de organismos são entendidas hoje como o resultado do processo evolutivo. Os seres vivos não são entidades estáticas, mas se transformam ao longo de gerações sob influência biótica e abiótica (CHRISTELLER, 2005). Os IPs do tipo Kunitz em sementes de leguminosas são os tipos de inibidores mais antigos. De acordo com o modelo proposto por MURKHOPADHYAY (1999) os IPs tipo Kunitz em leguminosas surgiram de uma proteína ancestral com o tamanho e a forma do subdomínio β -folha, que após sucessivas duplicações e eventos genéticos (mutações, inserções, por exemplo) originou a família dos inibidores tipo Kunitz (FIGURA 1).

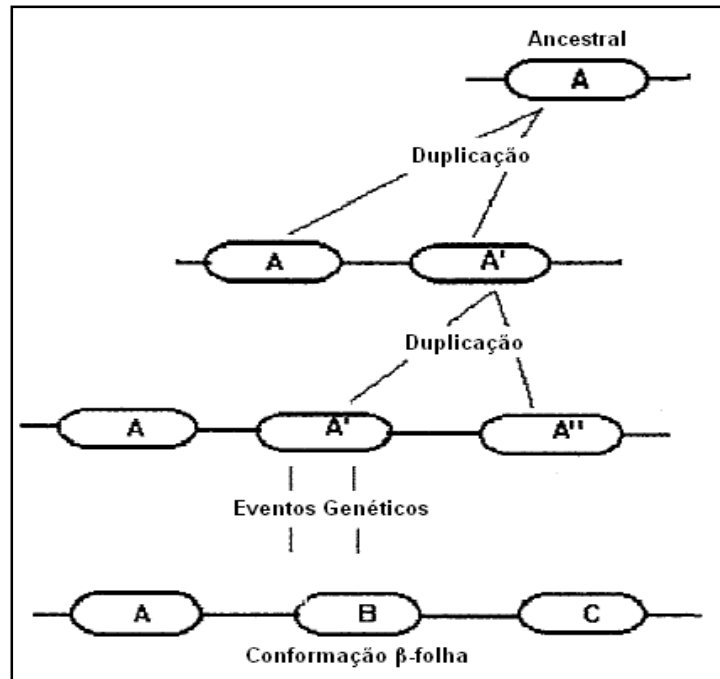


Figura 1. Diagrama modificado do modelo proposto por Murkhopadhyay (1999), em que os IPs do tipo Kunitz se originaram de um domínio ancestral que sofreu sucessivos eventos genéticos até a conformação final β -folha.

1.7 ESTRUTURA DOS INIBIDORES DE PROTEINASES DO TIPO KUNITZ

A estrutura tridimensional da família de inibidores tipo Kunitz é conhecida como família β -folhas sendo composta por 12 conformações betas anti-paralelas conectadas por longas alças. O inibidor pode ser dividido em três subdomínios, cada um contendo cerca de 60 resíduos de aminoácidos. Cada subdomínio consiste de quatro folhas beta conectadas por longas alças, estruturalmente organizadas como A- β 1-A- β 2-A- β 3-A- β 4, em que "A" refere-se as alças que conectam as folhas beta (FIGURA 2). A estabilidade da estrutura tridimensional de muitos inibidores da família tipo Kunitz é dada pela presença de inúmeras pontes de hidrogênio em conjunto com as pontes dissulfeto presentes na estrutura do inibidor (SONG; SHU, 1998; KRAUCHENCO, et al., 2003, 2004; SATTAR, et al., 2004; KRAMRUI, et al., 2005). As pontes dissulfeto são interações covalentes entre dois resíduos de aminoácido de cisteína que conectam duas subunidades dos IPs, elas podem ser formadas tanto intra ou intercadeias quanto ambas simultaneamente conferindo maior estabilidade a estrutura tridimensional do

inibidor. Os IPs que não apresentam duas cadeias polipeptídicas podem apresentar a formação de pontes dissulfeto.

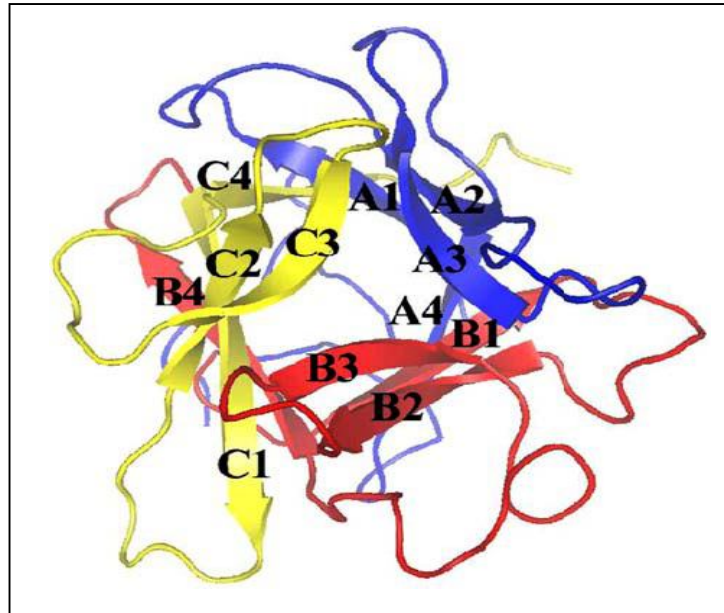


Figura 2. Estrutura do inibidor tipo Kunitz de *Delonix regia*. A proteína é formada de conformações beta com três repetições A-C, pintadas em azul, vermelho e amarelo, respectivamente (KRAUCHENCO *et al.*, 2003).

Os IPs da família tipo Kunitz apresentam estruturalmente uma alça de ligação exposta, que é conservada em todos os representantes (FIGURA 3a), essa estrutura é denominada de conformação canônica (BODE; HUBER, 1992). Esses inibidores que apresentam a conformação canônica formam complexos estáveis com a proteinase alvo, a qual se dissocia lentamente (RITONJA, *et al.*, 1990). A alça de ligação (FIGURA 3b), embora freqüentemente hidrofóbica, é estabilizada por interações adicionais entre os resíduos que flanqueiam o local do sitio reativo e o núcleo do inibidor (GRÜTTER, *et al.*, 1988).

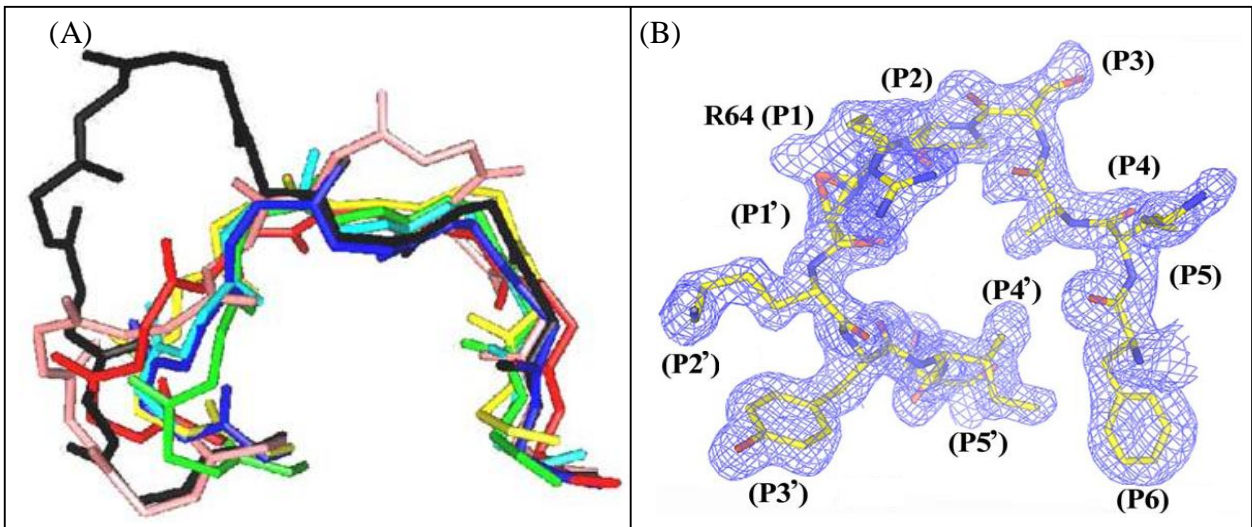


FIGURA 3. (a) Sobreposição estrutural do esqueleto das alças de ligação dos inibidores tipo Kunitz, *Glycine max* em azul, *Delonix regia* em vermelho, *Erythrina caffra* em amarelo, *Copaifera langsdorffii* em ciano, *Psophocarpus tetragonolobus* (WBA) em preto, *Hordeum vulgare* em rosa e *Psophocarpus tetragonolobus* (WCI) em verde. (b) Alça de ligação demonstrando o resíduo de arginina na posição 64 característico da família dos inibidores tipo Kunitz.

1.8 MECANISMO DE INIBIÇÃO DOS INIBIDORES DE PROTEINASES DO TIPO KUNITZ

Os IPs do tipo Kunitz interagem com a enzima de acordo com o resíduo de aminoácido na posição P1, arginina ou lisina, que é o resíduo de maior importância na formação do complexo dos inibidores de tripsina, o resíduo de aminoácido P1 do inibidor é acolhido pelo vale formado pelos dobramentos das estruturas secundárias da enzima, denominado sitio catalítico S1, composto por resíduos que determinam a especificidade do inibidor (por exemplo, o resíduo P1 do inibidor de tripsina interage com o resíduo de serina S1 da tripsina). Essa interação direta do resíduo do sitio reativo do inibidor com o sitio catalítico da enzima caracteriza um mecanismo de inibição competitivo, comum para inibidores de tripsina da família Kunitz (BODE; HUBER, 1992, 2000; FRANCO et al., 2002; MANDAL et al., 2002, BHATTACHARYYA et al., 2006). Entretanto a interação direta do resíduo do sitio reativo do inibidor com outro sitio, que não o catalítico da enzima, caracteriza um mecanismo de inibição não competitivo, pouco comum para os inibidores de tripsina da família Kunitz (PRABHU et al., 1980). Além desses, há o mecanismo de inibição misto que envolve tanto inibição competitiva

como não competitiva incomum para os inibidores tipo Kunitz (BHATTACHARYYA et al., 2007).

1.9 CLASSES DE INIBIDORES BIFUNCIONAIS

Nos últimos anos, os estudos em relação aos inibidores de proteinases bifuncionais (Tabela 3) em leguminosas vêm recebendo atenção especial devido ao fato dessas proteínas possuírem a capacidade de suprimir a atividade proteolítica de classes diferentes de proteinases. Esses inibidores bifuncionais interferem nos processos digestivos de insetos pragas interagindo em classes diferentes de enzimas (Oliveira et al. 2002; Macedo et al. 2004; Gomes et al. 2005a; Oliveira et al. 2007). Essas enzimas são causadoras de danos em grãos de cereais e leguminosas armazenados, acarretando grandes perdas econômicas na agricultura mundial. Portanto a purificação e caracterização de inibidores de proteinases bifuncionais presentes nas sementes, à determinação da especificidade de inibição, à determinação dos mecanismos de inibição e os estudos *in silico* da especificidade dos inibidores bifuncionais, associada a sua evolução em plantas são de grandes importâncias para direcionar a indicação de proteínas inibidoras candidatas em estudos de transformação de plantas. Dentro desse contexto, nenhum estudo *in silico* foi desenvolvido sobre a interação do inibidor bifuncional de *Adenantha pavonina* (ApTKI) e as enzimas serínica (tripsina) e cisteínica (papaína).

Tabela 3. Inibidores bifuncionais.

Fonte	Atividade Inibitória	Referência
Cevada	α -amilase de inseto, planta e subtilisina	ABE; SIDENIUS, SVENSSON, 1993
Arroz	α -amilase de inseto, planta e subtilisina	YAMAGATA, et al., 1998
Trigo	α -amilase de inseto e subtilisina	ZEMKE, et al., 1991
Milho	α -amilase de inseto e tripsina	SCHIMOLER-OROURKE; RICHARDSON; SELITRENNIKOFF, 2001
Milheto	α -amilase de inseto e tripsina	STROBL, et al., 1998
Feijão	α -amilase de inseto e quitinase	DAYLER, et al., 2005
Lágrima de Jó	α -amilase de inseto e quitinase	ARY; RICHARDSON; SHEWRY, 1989
Abacaxi	tripsina, quimotripsina, papaína, catepsina L, bromélaína e ficina	LENARCIC, et al., 1993, PERLSTEIN; KEZDY, 1973
Crotalaria	tripsina, quimotripsina, elastase e papaína	GOMES, et al., 2005a
Algaroba	tripsina, quimotripsina e papaína	OLIVEIRA, et al., 2002
Carolina	tripsina, quimotripsina e papaína	MACEDO, et al., 2004
Jurema branca	tripsina, quimotripsina e papaína	OLIVEIRA, et al., 2007

2 OBJETIVOS

Determinar, *in silico*, se os sítios de interação para tripsina e papaína encontrados no inibidor bifuncional tipo Kunitz de *Prosopis juliflora* são conservados em outros inibidores do tipo Kunitz em Mimosoideae.

Determinar, *in vitro*, o modelo de interação entre o inibidor tipo Kunitz de *Adenantha pavonina* (ApTKI) e as enzimas tripsina e papaína através de ensaios de inibição.

Propor, *in silico*, o modelo de interação entre o inibidor ApTKI e as enzimas tripsina e papaína pela metodologia de modelagem por homologia, indicando dessa maneira um novo candidato no desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas no controle de insetos pragas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

3.1 SEMENTES

As sementes secas de Carolina, *Adenanthera pavonina* (Figura 4) foram coletadas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, situada na cidade de Natal/ RN, para o isolamento e purificação do inibidor tipo Kunitz.

A. pavonina, pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae e tribo Mimoseae, é uma árvore que atinge cerca de 4,5 m de altura, nativa da Índia e China, mas atualmente é encontrada em regiões tropicais.



Figura 4. Foto ilustrativa da leguminosa da subfamília Mimosoideae *Adenanthera pavonina*.

3.1.2 REAGENTES

- Albumina sérica bovina – BSA (Sigma-USA);
- BApNA (α -benzoil-DL-arginine- ρ -nitroanilide/ Sigma-USA);
- Azocaseína (Sigma-USA);

- DMSO (dimetilsulfóxido/BDH GPR);
- SDS (duodecil sulfato de sódio - Reagen);
- Acrilamida e N'N'-metilenobisacrilamida; (Sigma-USA)
- Papaína (Sigma-USA);
- Tripsina (Sigma-USA);
- Padrões de peso moleculares para eletroforese (AMERSHAM – Pharmacia Biotech);
- Comassie Blue G-250 e R-250 (Sigma-USA);
- Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3.1.3 EQUIPAMENTOS

- Agitador Magnético Tecnal TE-081
- Espectrofotômetro HITACHI U-2000
- Banho-Maria (Tecnal TE-056)
- Balança analítica eletrônica – SCIENTCH AS 210
- Microcentrífuga Eppendorf 5410
- Centrifuga HITACHI CR 21
- Coletor de frações REDFRAC modelo 2112 da LKB (Bromma, Suécia)
- Sistema de Purificação: ÄKTA PURIFIER
- Computador Athlon AMD 64 processador 3800+ com 2G de memória RAM e 256 MB de placa de vídeo.

3.1.4 PROGRAMAS

- PSI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>);
- ClustalW (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>);
- PAUP versão 4.0 (SWOFFORD, 1999);

- SPDBV versão 4.0 (GUEX, et al., 1999);
- BioEdit versão 7.0 (HALL, 1997);
- SWISS-MODEL (ARNOLD, et al., 2006; KOPP; SCHWEDE, 2004; SCHWEDE et al., 2003; GUEX; PEITSCH, 1997);
- PROCHECK versão 3.5 (LASKOWSKI, et al., 1998);
- HEX versão 4.5 (RITCHIE, 1996);
- 3DSS (*3-Dimensional Structural Superposition*) (SUMATHI, et al., 2005).

MÉTODOS

3.2 FILOGENIA

As seqüências usadas para análise filogenética foram às seqüências de inibidores de proteinases tipo Kunitz das espécies da família Fabaceae disponíveis no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) com o número de acesso *Prosopis juliflora* cadeia beta (gi: 417177) e cadeia alfa (gi: 417176); *Acacia confusa* cadeia alfa (gi: 299509) e cadeia beta (gi: 299508); *Adenantha pavonina* cadeia alfa (gi: 124152) e cadeia beta (gi: 124153); *Leucaena leucocephala* cadeia alfa (gi: 18202442) e cadeia beta (18202443); *Enterolobium contortisiliquum* (Batista et al., 1995); *Delonix regia* (gi: 47115660); *Erythrina variegata* (gi: 262754); *Erythrina latissima* (gi: 60392436); *Erythrina caffra* (gi: 124154); *Bauhinia ruffa* (gi: 110279026); *Bauhinia bauhinioides* (gi: 25089820); *Cicer arietinum* (gi: 14161088); *Glycine max* (gi: 125023); *Medicago truncatula* (gi: 22001349); *Psophocarpus tetragonolobus* (gi: 417198). O alinhamento automático foi realizado com o programa ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e conferido visualmente pelo BioEdit. Os dados do alinhamento utilizando a matrix BLOSUM62 foram adquiridos no formato PIR e transformados para o formato NEXUS (MADDISON; SWOFFORD, 1997). O método de máxima parcimônia foi utilizado para procurar todas as topologias possíveis para identificar a árvore adequada. A análise de *bootstrap* foi usada para avaliar a robustez da árvore com 100 réplicas (FELSENSTEIN, 1985).

3.3 MODELO DE INTERAÇÃO ENZIMA-INIBIDOR

3.3.1 PREPARO DA FARINHA DE *ADENANTHERA PAVONINA*

As sementes foram trituradas em liquidificador industrial e passadas no moinho elétrico para a obtenção de uma farinha de granulação fina.

3.3.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO DA FARINHA

O extrato bruto da farinha da semente de *A. pavonina* foi obtido a partir da homogeneização em tampão tetraborato de sódio 50 mM, pH 7,5 na proporção de 1:10 (p/v) sob agitação constante por 2 horas à temperatura ambiente. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Os precipitados foram descartados e o sobrenadante filtrado em lã de vidro e denominado de EB (extrato bruto).

3.3.3 FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIA

O extrato bruto foi fracionado com sulfato de amônio em três etapas de saturação: 0-40%, 40-60%, 60-90%. Após cada etapa de saturação, a solução permaneceu a 4°C por aproximadamente 20 horas e posteriormente foi centrifugada a 12.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Os precipitados resultantes de cada fracionamento foram ressuspensos no menor volume possível de água destilada, e submetidos à diálise contra a água destilada por aproximadamente 18 horas. Após diálise as frações de ambas as amostras foram liofilizadas e denominadas F0-40, F40-60, F60-90, de acordo com o grau de saturação.

3.3.4 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SEPHACRYL S100

Para o isolamento dos inibidores de proteinases serínicas, presentes nas sementes de *A. pavonina*, foram utilizados 50 mg de proteínas da fração F40-60%. Essa quantidade de proteínas foi aplicada na coluna de gel filtração Sephacryl S100 previamente equilibrada com tampão tetraborato de sódio 50 mM pH 7,5 sob um fluxo de 0,75 ml/min. Cerca de 1,5 ml das amostras foram coletadas e a absorbância medida a 280 nm. Ensaios de atividades antitripticas foram realizados para a identificação dos picos de inibição. Identificado o pico de inibição, o pico protéico com inibição foi coletado dialisado em água destilada e liofilizado. O material liofilizado foi aplicado na coluna Superose 12 do sistema de purificação ÄKTA.

3.3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Medidas de densidade óptica a 280nm foram mensuradas para acompanhamento de corridas cromatográficas.

3.3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITRÍPTICA

As atividades anti-tríptica da fração foi determinada com alíquotas de 10µL das soluções de tripsina bovina (0,3 mg/mL tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5). A enzima foi pré-incubada com 610 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 120 µL de HCl 0,0025 M e 50 µL da amostra por 15 minutos a 37 °C. Após esse período de tempo a reação foi iniciada adicionando 500 µL de solução de substrato específico (BApNA 1,25 mM). A reação foi processada por mais 15 minutos nas mesmas condições de incubação, e em seguida foi paralisada adicionando 120 µL de solução de ácido acético 30%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as provas em branco em duplicata. A absorbância foi medida a 410 nm. Uma unidade de inibidor (UI) foi definida como a

quantidade de inibidor que diminuiu a atividade da enzima em 0,01 da absorbância a 410 nm.

3.3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPAPAINÁSICA

Para a determinação da atividade anti-papainásica foi determinada com alíquotas de 10 µL da solução de papaína (1 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5). A enzima foi pré-incubada com 400 µL de tampão fosfato de sódio, pH 6,0, 40 µL de solução ativadora contendo L-cisteína 0,05 M e EDTA 0,02 M pH 8,0 e 50 µL da amostra por um período de 10 minutos a 37 °C. Passados 10 minutos a reação foi iniciada acrescentando 200 µL de solução de substrato específico (BANA 1 mM). A reação foi paralisada com 500 µL de HCl 2% em etanol após 20 minutos de reação, e em seguida foi adicionado 500 µL de reagente de cor (0,06% de p-Dimetilaminocinamaldeído em 100 mL de etanol). Decorridos 20 minutos após adição do reagente de cor, a absorbância foi medida a 540 nm. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração inibidora, nas mesmas condições acima descrita. Os ensaios foram realizados em triplicata e as provas em branco em duplicata para controle da reação.

3.3.8 ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENZIMA-INIBIDOR POR CINÉTICA ENZIMÁTICA

Amostras contendo alíquotas do complexo inibidor-papaína, inibidor-tripsina, enzimas e inibidor separados foram pré-incubados com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, 120 µL de HCl 0,0025 M (ensaio tripsina) ou 40 µL de solução ativadora (ensaio papaína) a 15 minutos a 37 °C. A reação foi iniciada com a adição de 200 µL de azocaseína 1% e após 30 minutos na mesma temperatura a reação foi paralisada com TCA 20%. A mistura de reação foi centrifugada por 10 minutos a 12000 x g. Alíquotas de 500 µL dos sobrenadantes foram adicionados a 500 µL de NaOH 2 N, e a absorbância foi medida a 440 nm. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração inibidora, nas mesmas condições acima descrita.

3.3.9 MODELAGEM DO INIBIDOR APTKI

A metodologia de modelagem por homologia foi constituída basicamente por quatro etapas sucessivas: a identificação da(s) proteína(s)-molde, o alinhamento entre as seqüências, a construção das coordenadas e a validação do modelo. A seguir foram descritos os processos utilizados em cada uma das etapas.

a) Identificação, seleção de proteínas-molde

O passo inicial na modelagem comparativa foi identificar todas as proteínas relacionadas à seqüência alvo, selecionando quais serão usadas como molde. A seqüência correspondente ao inibidor resolvido experimentalmente com alto percentual de identidade foi selecionada para a criação do modelo tridimensional do inibidor de *A. pavanina*. O programa BlastP (Altschul et al. 1997), que busca por regiões contendo similaridade local entre duas seqüências, foi utilizado na busca por estruturas molde, para a aplicação da metodologia de modelagem molecular comparativa. Este programa compara as seqüências de proteínas contra bancos de dados (o utilizado foi o Banco de Dados de Proteína ou PDB). A estrutura do inibidor 1ba7 corresponde ao inibidor tripsina de soja resolvido por difração de raio-X. Essa estrutura foi selecionada como molde, devido a sua similaridade seqüencial mais significativa ao inibidor tipo Kunitz em estudo.

b) Alinhamento entre as seqüências

Definido o molde, nessa etapa, foi realizado o alinhamento múltiplo entre as seqüências do inibidor em estudo e o inibidor resolvido por cristalografia, utilizando o programa ClustalW (Thompson et al. 1994), com as configurações padrão.

c) Construção do modelo

A modelagem por homologia foi empregada para a construção do modelo 3D da proteína alvo, com o resultado do alinhamento da seqüência alvo e o molde. O método utilizado para a construção do modelo 3D foi o de modelagem pela satisfação de restrições espaciais. Este método calcula as restrições espaciais da estrutura molde e usando o alinhamento múltiplo, as aplica a seqüência alvo. O modelo é derivado da minimização das violações das restrições espaciais, e construído pela imposição dessas restrições de ângulos e distâncias na seqüência alvo, derivadas do alinhamento com o molde.

O programa SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006; Kopp and Schwede 2004; Schwede *et al.*, 2003; Guex and Peitsch, 1997), foi utilizado na construção do modelo tridimensional da proteína alvo, este programa automático on line utiliza a seqüência no formato PDB adquirida do alinhamento com o molde pelo programa SPDBV (Guex *et al.*, 1999), para a construção do modelo levando em conta as parâmetros estereoquímicos anteriormente citados e otimiza a estrutura através da minimização de energia (minimização mecânica).

A estrutura do inibidor com o código PDB, 1ba7, foi responsável por toda a construção do modelo 3D da seqüência do inibidor em estudo.

d) Validação do modelo

A etapa final do processo de modelagem consiste em avaliar os diferentes níveis de organização estrutural. Nessa etapa analisam-se os vários níveis de empacotamento global da proteína, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estequiométricos.

O programa utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos foi o PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1998), o qual avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares

de átomos não ligados e a qualidade do Mapa de Ramachandran (Ramachandran, 1968).

O programa 3DSS (Sumathi *et al*, 2005), foi usado para o cálculo do RMSD e a sobreposição estrutural do modelo obtido por modelagem comparativa e a estrutura resolvida por difração de raio-X utilizada como molde.

3.3.10 ACOPLAMENTO DO INIBIDOR KUNITZ EM COMPLEXO COM TRIPSINA E COM PAPAÍNA

As coordenadas, para a criação do complexo com tripsina foi extraído da estrutura com o código PDB, 1ba7. O complexo protéico foi criado utilizando o modelo do inibidor e a estrutura resolvida por cristalografia da tripsina adquirida no PDB com o código 1fn6. No complexo protéico realizado para papaína a estrutura adquirida foi retirada do PDB com o código 9pap.

O programa HEX versão 4.5 (Ritchie, 1996), foi utilizado para construção das interações entre o inibidor e as enzimas, o docking foi realizado com os parâmetros de total rotação para os receptores e os ligantes, utilização da superfície e das cargas das proteínas, como filtro foi utilizado a opção de reentrância, a qual diminui o espaço entre o complexo encaixando-o na superfície e todos os complexos foram energeticamente minimizados. Foram construídas 500 soluções para as duas proteinases. As interações foram analisadas buscando os melhores resultados.

4 RESULTADOS

4.1 FILOGENIA

4.1.1 ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA DOS IPS TIPO KUNITZ DE LEGUMINOSAS E DISTRIBUIÇÃO FILOGENÉTICA

O alinhamento múltiplo de 15 seqüências dos inibidores de proteinase (IPs) do tipo Kunitz de sementes das três subfamílias de leguminosas (3 Caesalpinoideae, 7 Papilionoideae e 5 Mimosoideae) revelaram vários níveis de similaridades. De acordo com o tamanho e similaridade, as seqüências dos 15 IPs do tipo Kunitz apresentaram 17% de similaridade entre as seqüências primárias completas que foram analisadas (Figura 5). A subfamília Caesalpinoideae, considerada a mais primitiva entre as plantas da família das leguminosas, apresentou 56% de similaridade entre as 3 seqüências alinhadas (Figura 6); os inibidores da subfamília Papilionoideae, os quais são consideradas o grupo de plantas mais recentes, apresentaram cerca de 40% de similaridade entre 7 seqüências primárias (Figura 7). A subfamília Mimosoideae apresentou alto grau de similaridade, cerca de 65% entre todos os 5 inibidores alinhados, com 18% de forte similaridade, 10% de fraca similaridade e 37% de identidade entre os resíduos de aminoácidos alinhados (Figura 8).

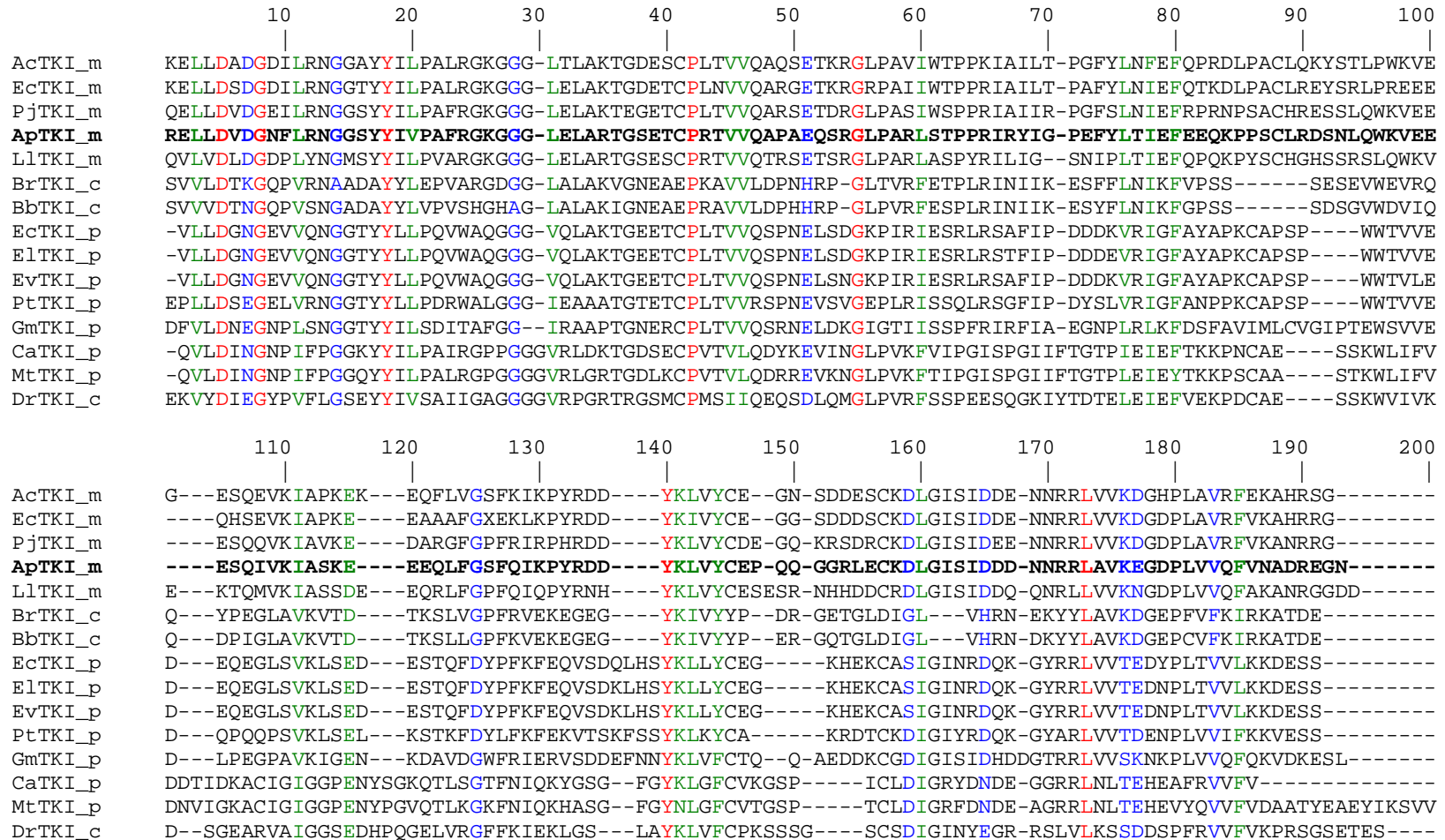


Figura 5. Alinhamento múltiplo da seqüência dos inibidores tipo Kunitz em leguminosae. Os três grupos taxonômicos Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae estão representados em “m”, “c” e “p”, respectivamente. Em vermelho, verde e azul os resíduos de aminoácido idênticos, com forte similaridade e fraca similaridade, respectivamente. **AcTKI**, *Acacia confusa*; **EcTKI**, *Enterolobium contortisiliquum*; **PjTKI**, *Prosopis juliflora*; **ApTKI**, *Adenanthera pavonina*; **LITKI**, *Leucaena leucocephala*; **BrTKI**, *Bauhinia ruffra*; **BbTKI**, *Bauhinia bauhinoides*; **EcTKI**, *Erythrina caffra*; **EITKI**, *Erythrina latissinia*; **EvTKI**, *Erythrina variegata*; **PtTKI**, *Psopocarpus tetragonolobus*; **GmTKI**, *Glycine max*; **CaTKI**, *Cicer arientum*; **MtTKI**, *Medicago truncatula*; **DrTKI**, *Delonix regia*.

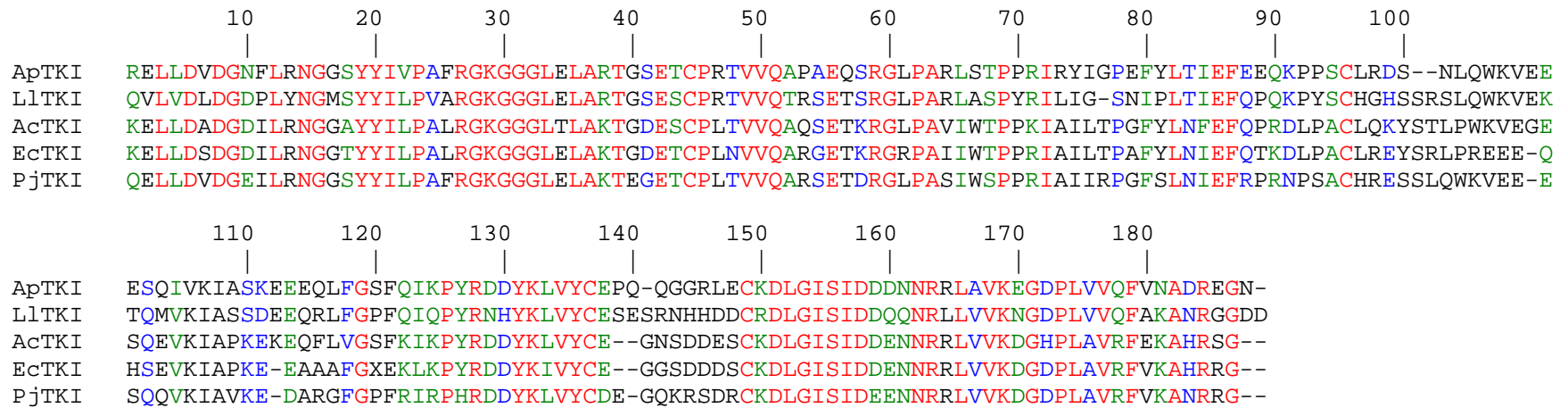


Figura 6. Alinhamento da seqüência primária dos inibidores tipo Kunitz da subfamília Mimosoideae. Em vermelho, verde e azul os resíduos de aminoácido idênticos, com forte similaridade e fraca similaridade, respectivamente.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
BrTKI  SVVLDTKGQPVRNAADAYYLEPVA-RGDGGLALAKVGNPAEKAVVLDP-NHRPGLTVRFETPLRIN-IIKESFFLNLIKfV--PSSSESEVWEVRQ-----
BbTKI  SVVVDtNGQPvSNGADAYYLVPVS-HGHAGLALAKIGNEAEPRAVVLDP-HHRPGLPVRfESPLRIN-IIKESYfFLNLIKfG--PSSSDSGVWDVIQ-----
DrTKI  EKvYDIeGYpVFLGSEYyIVSAIIGAGGGGVRPGRTRGSMCPMSIIQEQLQMGlpVRFSSPEESQgKIYTDTELEIEfVEKpDCAESsKwVIVKDSGE

      110     120     130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |      |      |
BrTKI  -QYpEGLAVKvTDTKSLVgPFRVKEKEG-EGYKIvYYPDRGE-TGLDIGLVHRNEK-YYLAVKDGEPFVfKIRKATDE-----
BbTKI  -QDPiGLAVKvTDTKSLLGpFKVKEKEG-EGYKIvYYPERgQ-TGLDIGLVHRNDK-YYLAVKDGEPcVfKIRKATDE-----
DrTKI  ARVAiGgSEdHPQgELVRGfFKIEKLgSLAYKLVfCPKSSSGSCSDiGINyEGRRSLVlKSDDSPFRVvVfKPRsGSETES

```

Figura 7. Alinhamento da seqüência primária dos inibidores tipo Kunitz da subfamília Caesalpinoideae. Em vermelho, verde e azul os resíduos de aminoácido idênticos, com forte similaridade e fraca similaridade, respectivamente.

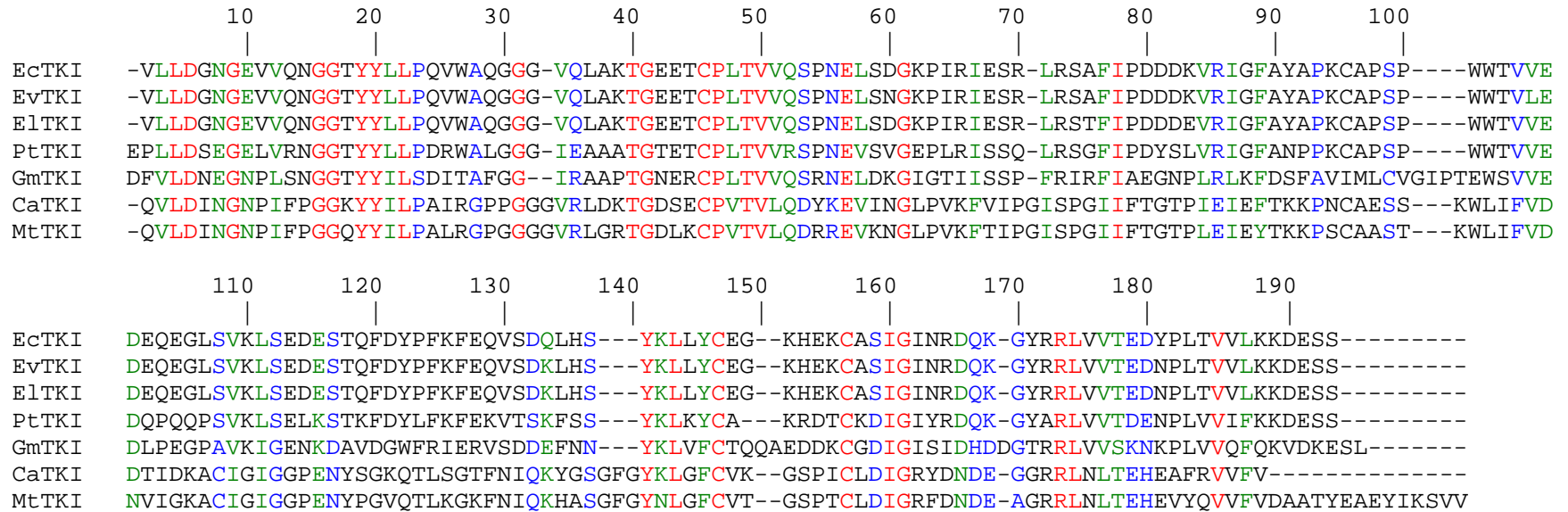


Figura 8. Alinhamento da seqüência primária dos inibidores tipo Kunitz da subfamília Papilionoideae. Em vermelho, verde e azul os resíduos de aminoácido idênticos, com forte similaridade e fraca similaridade, respectivamente.

Esses IPs de leguminosas podem ser agrupados de acordo com a especificidade de inibição frente as classe mecanística de suas enzimas alvos, tendo como base o domínio STI (Inibidor de Tripsina de Soja) que é uma referência para a família de inibidores do tipo Kunitz (Tabela 4). De acordo com a especificidade, os IPs foram classificados como: STI clássicos (atuam somente inibindo um tipo de enzima e são classificados como inibidores de tripsina, inibidores de quimotripsina, inibidores de elastase ou inibidores de subtilisina); STI duplos (atuam inibindo dois tipos de enzimas de uma mesma classe mecanística, por exemplo, inibidor de tripsina que ao mesmo tempo inibe qualquer outra proteinase serínica); e STI bifuncionais (atuam sobre enzimas de classe mecanística diferentes, por exemplo, os inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas).

A análise filogenética dos 15 IPs (Figura 9), cruzando os parâmetros homologia e classificação de acordo com a especificidade, indicou que os inibidores que apresentaram o caráter STI clássico foram reunidos em dois grupos taxonômicos, um representado pelo grupo de inibidores da subfamília Papilionoideae e o outro representado pelo grupo de inibidores da subfamília Caesalpinoideae. A exceção foi o inibidor da semente de soja, um STI duplo, representante da família Papilionoideae que ficou agrupado dentre os grupos de IPs STI clássicos.

A subfamília Mimosoideae, que apresentou um alto grau de conservação de suas seqüências primárias, formou um único grupo, onde o caráter STI duplo e STI bifuncional foram predominantemente encontrados. A árvore filogenética não enraizada construída mostrou que a classe STI bifuncional ficou agrupada claramente na subfamília Mimosoideae, representado pelos únicos inibidores com seqüência completa de *Prosopis juliflora* (PjTKI) e *Adenantha pavonina* (ApTKI), que apresentaram entre si alto grau de similaridade das seqüências (Figura 10). Entretanto um aumento das seqüências primárias disponíveis em banco de dados e as caracterizações bioquímicas com relação à especificidade de inibição de outros inibidores desta subfamília poderiam dar um maior suporte a este resultado.

Tabela 4. Classificação dos inibidores de proteinase do tipo Kunitz de acordo com o domínio STI encontrado no inibidor da semente de soja.

Nome Científico	Sigla	Subfamília	Especificidade	Classificação
<i>Delonix regia</i>	DrTKI	Caesalpinioideae	Trip	STI clássico
<i>Bauhinia ruffa</i>	BrTKI	Caesalpinioideae	Trip	STI clássico
<i>Bauhinia bauhinioides</i>	BbTKI	Caesalpinioideae	Trip	STI clássico
<i>Cicer arietinum</i>	CaTKI	Papilionoideae	Trip	STI clássico
<i>Medicago truncatula</i>	MtTKI	Papilionoideae	Trip	STI clássico
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	PtTKI	Papilionoideae	Trip	STI clássico
<i>Erythrina variegata</i>	EvTKI	Papilionoideae	Trip	STI clássico
<i>Erythrina latissima</i>	EITKI	Papilionoideae	Trip	STI clássico
<i>Erythrina caffra</i>	EcTKI	Papilionoideae	Trip	STI clássico
<i>Glycine max</i>	GmTKI	Papilionoideae	Trip-Quim	STI duplo
<i>Acacia confusa</i>	AcTKI	Mimosoideae	Trip-Quim	STI duplo
<i>Leucaena leucocephala</i>	LITKI	Mimosoideae	Trip-Quim	STI duplo
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	EcTKI	Mimosoideae	Trip-Quim	STI duplo
<i>Prosopis juliflora</i>	PjTKI	Mimosoideae	Trip-Quim-Pap	STI bifuncional
<i>Adenanthera pavonina</i>	ApTKI	Mimosoideae	Trip-Quim-Pap	STI bifuncional

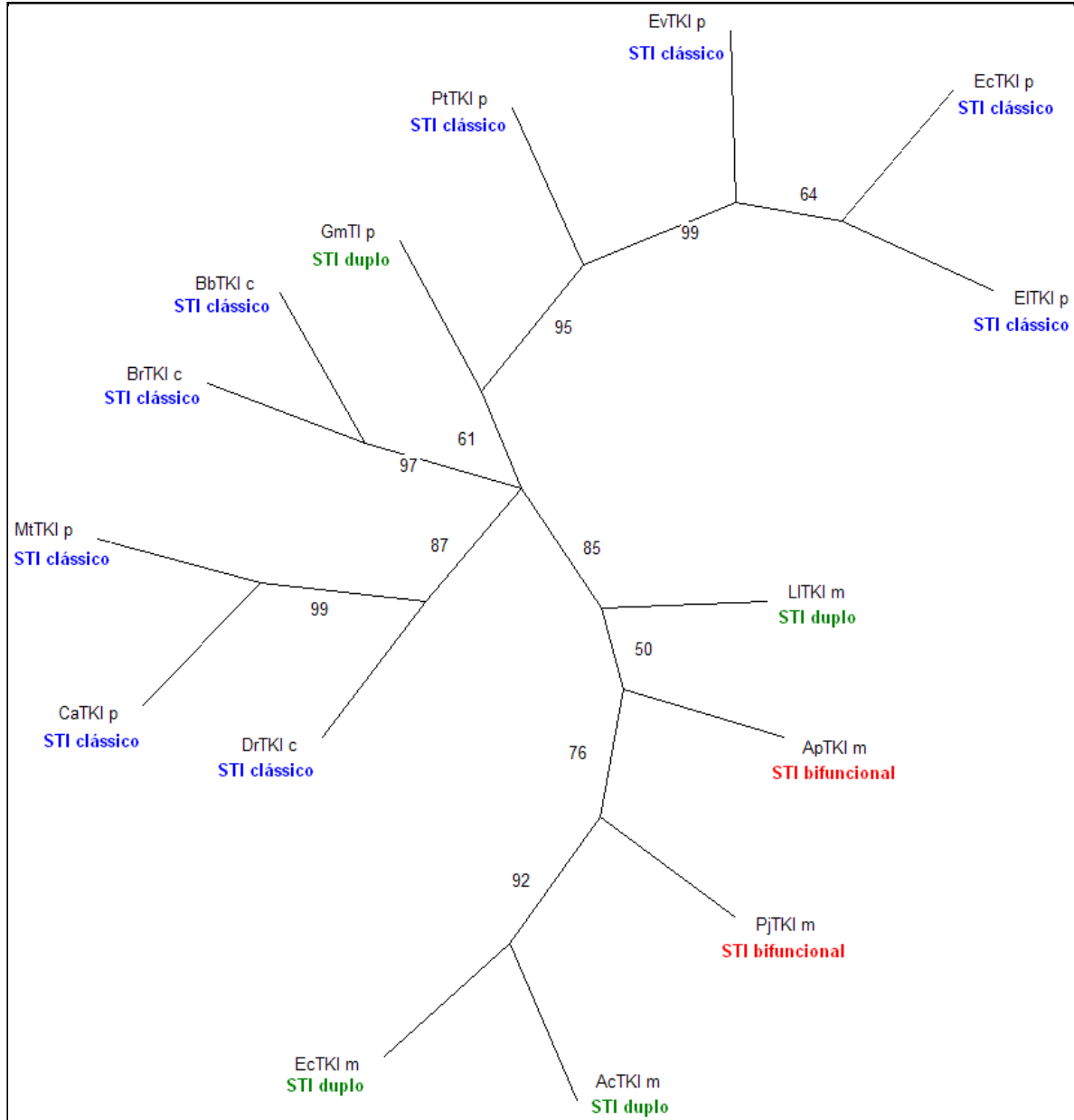


Figura 9. Árvore filogenética construída relacionando o inibidor de *Adenanthera pavonina* com as três classes de especificidade. A análise filogenética destas seqüências foi realizada utilizando o método de máxima parcimônia com o programa PAUP. Todos os ramos resultaram de bootstrap acima de 50%. **PjTKI** – *Prosopis juliflora*. **AcTKI** – *Acacia confusa*. **ApTKI** – *Adenanthera pavonina*. **LITKI** – *Leucaena leucocephala*. **EcTKI** – *Enterolobium contortisiliquum*. **DrTKI** – *Delonix regia*. **EvTKI** – *Erythrina variegata*. **EITKI** – *Erythrina latíssima*. **EcTKI** – *Erythrina caffra*. **BrTKI** – *Bauhinia ruffa*. **BbTKI** – *Bauhinia bauhinioides*. **CaTKI** – *Cicer arietinum*. **GmTKI** – *Glycine max*. **MtTKI** – *Medicago truncatula*. **PtTKI** – *Psophocarpus tetragonolobus*.

```

ApTKI  RELLDVDGNFLRNGGSYYIVPAFRGKGGGLELARTGSETCPRTVVQAPAEQSRGLPARLSTPPRIRYIGPEFYLTIEFEEQKPPSCLRDSNLQWKVEEE
PjTKI  QELLDVDGEILRNGGSYYIILPAFRGKGGGLELAKTEGETCPLTVVQARSETDRGLPASIWSPPRIAIIIRPGFSLNIEFRPRNPSACHRESSLQWKVEEE
:*****: *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
          110      120      130      140      150      160      170      180
ApTKI  SQIVKIASKEEQLEFQSGFQIKPYRDDYKLVYCEPQGGRLLECKDLGISIDDDNNRRLAVKEGDPLVVQFVNADREGN
PjTKI  SQQVKIAVKEDARGFGPFRIIRPHRDDYKLVYCEDEGQKRSDRCKDLGISIDEENNRRLLVVKDGDPLAVRFVKANRRG-
**  ****  **:  **  *:***:*****:  *  .*****:*****.***:****.***:***.*  *

```

Figura 10. Alinhamento entre as seqüências primária dos inibidores bifuncionais de *Adenantha pavonina* e *Prosopis juliflora*. Em vermelho, verde e azul os resíduos de aminoácido idênticos, com forte similaridade e fraca similaridade, respectivamente.

4.1.2 ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA DOS IPS DO TIPO KUNITZ EM MIMOSOIDEAE

Dentre os dois inibidores bifuncionais, apenas o inibidor de *Prosopis juliflora* (PjTKI) teve seu modelo de interação frente as suas duas enzimas alvos (tripsina e papaína) resolvido *in silico* (FRANCO, et al., 2002). Os resíduos de aminoácidos, triptofano (Trp60), arginina (Arg64) e dois ácidos glutâmicos (Glu89 e Glu109) estavam envolvidos na interação do inibidor de Kunitz de *P. juliflora* com a enzima papaína. Estes resíduos foram então usados para se saber se estes eram conservados nos outros 5 inibidores de Kunitz pertencentes a esta subfamília. Na análise pode-se observar que o inibidor STI bifuncional de *A. pavonina* (ApTKI) possuía os resíduos de aminoácidos arginina (Arg64) e ácido glutâmico (Glu109) conservados, e que o resíduo de ácido glutâmico (Glu89) no inibidor de *P. juliflora* foi substituído por um resíduo de ácido aspártico (Asp89) na mesma posição, ambos aminoácidos de mesma natureza ácida provavelmente desempenhando a função observada no inibidor de *P. juliflora*. Outros integrantes dessa subfamília apresentaram esses resíduos completamente idênticos como é o caso do inibidor de *E. contortisiliquum* (EcTKI), mas a sua especificidade *in vitro* frente à proteinase cisteínica não foi ainda identificada, sendo ainda classificado apenas como um inibidor STI duplo. O inibidor da semente de *A. confusa* (AcTKI) apresentou o resíduo de arginina substituído pelo de lisina (Lys64), o resíduo de triptofano foi conservado, mas em contra partida apresentou dois resíduos de lisina (Lys89 e Lys109) que possivelmente desfavoreceria a interação frente à papaína. O inibidor de *L. leucocephala* (LITKI) apresentou conservado somente o resíduo de arginina (Arg64) na seqüência de interação e provavelmente por esta razão este inibidor não possuiria atividade frente à enzima papaína, pois não haveria uma interação favorável para a formação do complexo (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação dos resíduos do sítio ativo do inibidor para tripsina (resíduo na posição 64) e papaína (resíduos nas posições 60, 89, 109) de *P. juliflora* com os demais integrantes da subfamília Mimosoideae.

Mimosoidea	Sítio de Interação			
<i>P. juliflora</i> (PjTKI)	Trp60	Arg64	Glu89	Glu109
<i>A. pavonina</i> (ApTKI)	Ser60	Arg64	Asp89	Glu109
<i>E. contorsiliquum</i> (EcTKI)	Trp60	Arg64	Glu89	Glu109
<i>A. confusa</i> (AcTKI)	Trp60	Lys64*	Lys89	Lys109
<i>L. leucocephala</i> (LITKI)	Ala60	Arg64	Ser89	Asp109

* resíduos de lisina do sítio reativo do inibidor de *Acacia confusa*.

4.2 MODELO DE INTERAÇÃO *IN VITRO* DE APTKI PARA AS ENZIMAS TRIPSINA E PAPAÍNA

4.2.1. PURIFICAÇÃO DE APTKI

Para o estabelecimento dos padrões de interação *in vitro* de ApTKI frente às proteinases tripsina e papaína, foi realizado o isolamento e purificação do inibidor usando os seguintes passos de purificação: obtenção da fração 40-60% de saturação com sulfato de amônio, que foi denominado F2. Essa fração F2, com alta atividade anti-trípica, foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100 (Figura 11). O perfil cromatográfico apresentou três picos protéicos bem definidos, sendo que o terceiro com inibição contra tripsina. As frações referentes ao terceiro pico protéico foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas, esse material foi denominado F2-3.

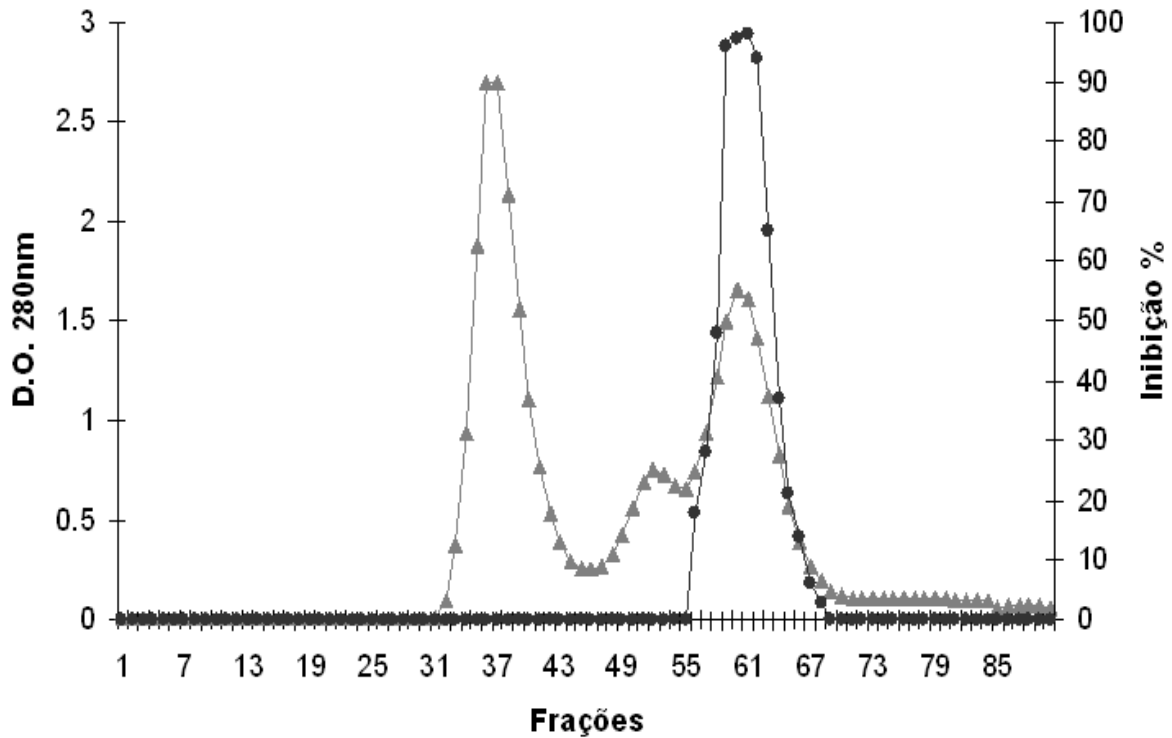


Figura 11. Perfil cromatográfico da fração F2 em gel filtração S100. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Bórax, pH 7,5. As frações protéicas foram coletadas em fluxo constante de 0,75 mL/min, ▲ densidade óptica medida a 280 nm e ● atividade anti-triptica avaliada usando 50 μ L de cada fração.

A fração protéica F2-3 foi submetida a outra cromatografia de exclusão molecular em matriz Superose 12, previamente calibrada com os marcadores de massa molecular, β -amilase (200 KDa), álcool desidrogenase (150 KDa), anidrase carbônica (29 KDa), inibidor do tipo Kunitz de soja (21 KDa). O inibidor de *A. pavonina* apresentou massa molecular de 22,5 KDa (Figura 12A e B).

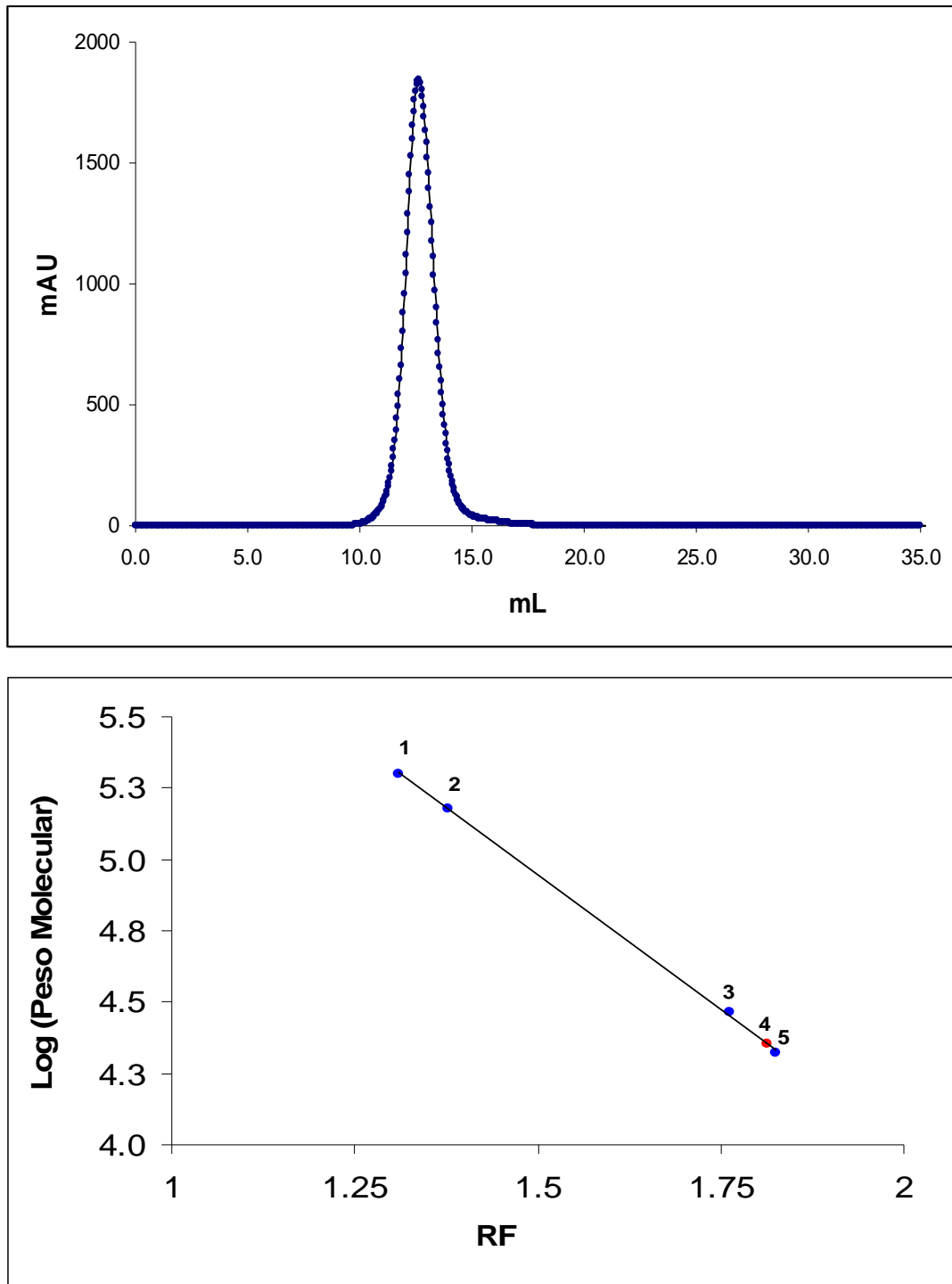


Figura 12. (A) Perfil cromatográfico da amostra F2-3 aplicada no sistema de purificação ÄKTA. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. As frações protéicas foram coletadas em fluxo constante de 0,5 mL/min. (B) Curva de calibração de molecular para o inibidor ApTKI. Marcadores de massa molecular (1) β -amilase (200 KDa), (2) álcool desidrogenase (150 KDa), (3) anidrase carbônica (29 KDa) e (4) ApTKI, (5) inibidor do tipo Kunitz de soja (21 KDa).

4.2.2. RELAÇÃO EQUIMOLAR DE APTKI PARA AS ENZIMAS PAPAÍNA E TRIPSINA

A relação equimolar de ApTKI para as proteinases serínica (tripsina) e cisteínica (papaína) foram determinados para dar suporte ao modelo de interação *in silico* de ApTKI. O ApTKI apresentou uma relação equimolar de $1,97 \times 10^{-10}$ mM (4,2 μ g) para a tripsina (Figura 13A) . Para a papaína foi encontrado uma razão equimolar de $5,91 \times 10^{-9}$ mM (124 μ g) (Figura 13B).

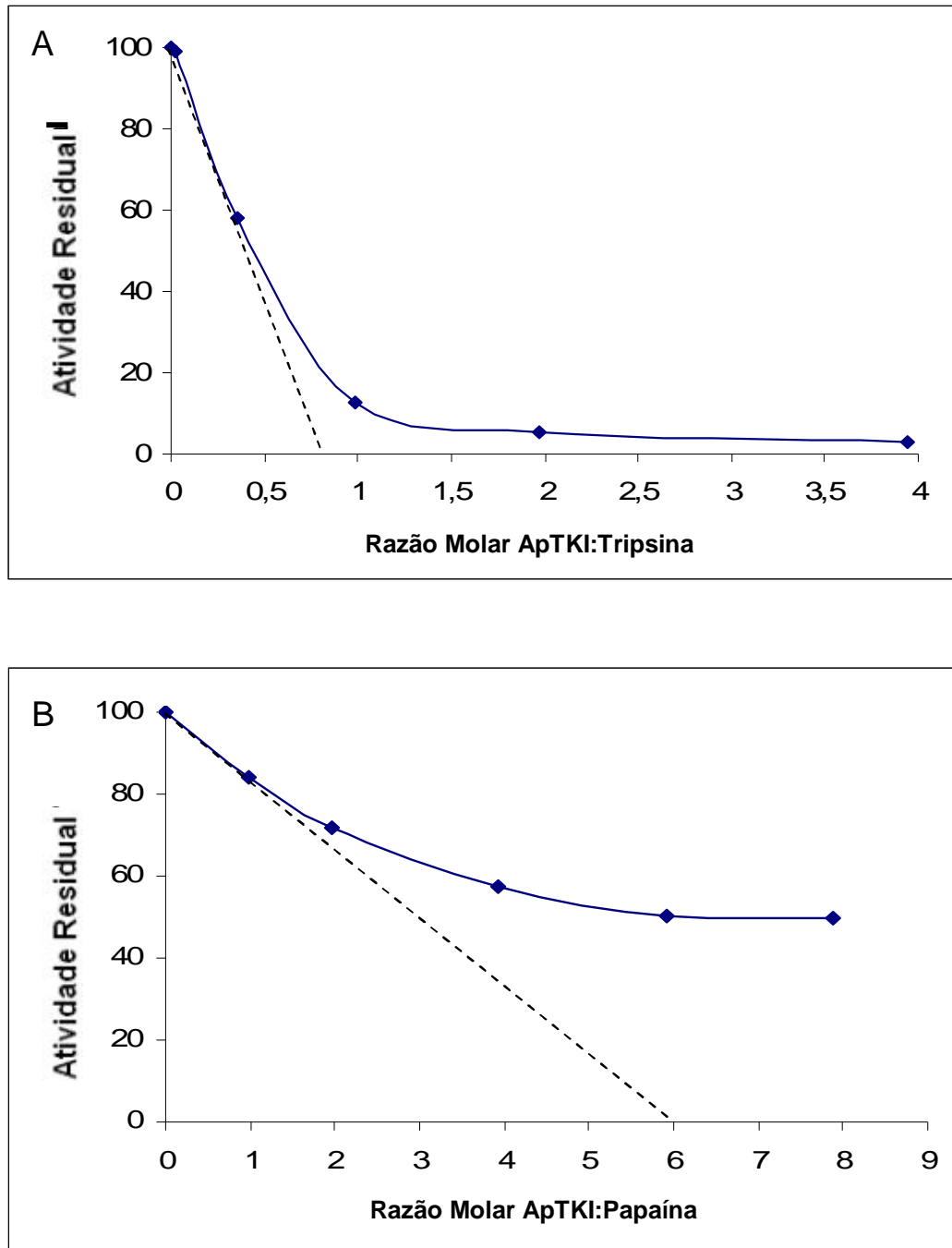


Figura 13. Curva de titulação do inibidor ApTKI. (A) efeito da atividade inibitória de ApTKI sobre a proteinase serínica (tripsina) e (B) sobre a proteinase cisteínica (papaína).

4.2.3. PADRÕES DE INTERAÇÃO *IN VITRO* APTKI-TRIPSINA E APTKI-PAPAÍNA

Para o estabelecimento dos padrões de interação foi utilizado a razão equimolar (inibidor:enzima) que resultasse na inibição de 100% da enzima do complexo e 100% da enzima teste. O inibidor ApTKI foi incubado com tripsina e testado contra papaína, também foi incubado com papaína e testado contra tripsina para revelar a hipótese de sobreposição do sitio de interação. Os resultados apresentados na tabela 6 indicam que os sítios para tripsina e papaína não são sobrepostos, pois o complexo binário ApTKI-Tripsina ou ApTKI-papaína não perdeu a atividade inibitória atingindo o valor de inibição semelhante quando o inibidor foi incubado com as enzimas em separado.

Tabela 6. Inibição da tripsina e papaína por ApTKI, ApTKI pré-incubada com ambas enzimas e atividade proteolítica das proteinases serínica e cisteínica.

	Atividade (U)	% Inibição
Tripsina	31.7	0.0
Tripsina + ApTKI	1.7	97
(Papaína + ApTKI) + Tripsina	2.5	91
Papaína	45.4	0.0
Papaína + ApTKI	23.6	48
(Tripsina + ApTKI) + Papaína	24.6	46

Ensaio foi realizado em triplicatas e azocaseína 1% como substrato.

4.3. MODELO DE INTERAÇÃO *IN SILICO* DE APTKI PARA AS ENZIMAS TRIPSINA E PAPAÍNA

4.3.1. MODELAGEM DE APTKI

A construção do modelo do inibidor de proteinase do tipo Kunitz ApTKI foi realizada pela obtenção da seqüência primária armazenada no banco de dados de seqüência do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) e consistiu das etapas:

a) Seleção do molde

Na construção do modelo da estrutura tridimensional do inibidor de *A. pavonina* foi utilizado o programa BlastP. A seqüência primária do inibidor ApTKI foi comparada com as seqüências de aminoácidos que possuíam estruturas resolvidas experimentalmente, por difração de raio-X, e depositadas no banco de dados de proteínas (PDB) do servidor SWISS-PROT. A seqüência do inibidor do tipo de Kunitz de soja por apresentar 40% de identidade com a seqüência do inibidor ApTKI foi escolhida como molde. O inibidor de soja possui a estrutura tridimensional resolvida por difração de raio-X, com resolução de 2,5Å, com número de acesso PDB, 1ba7, no banco de dados de proteínas.

b) Alinhamento das seqüências de ApTKI e o inibidor de tripsina de soja (1ba7)

Alinhamento seqüencial e estrutural foi realizado no programa SPDBV com a finalidade de construir um perfil estrutural do inibidor ApTKI. O inibidor apresentou cerca de 70% dos resíduos similares à seqüência primaria do inibidor de soja e 40% desses resíduos foram idênticos (Figura 14).

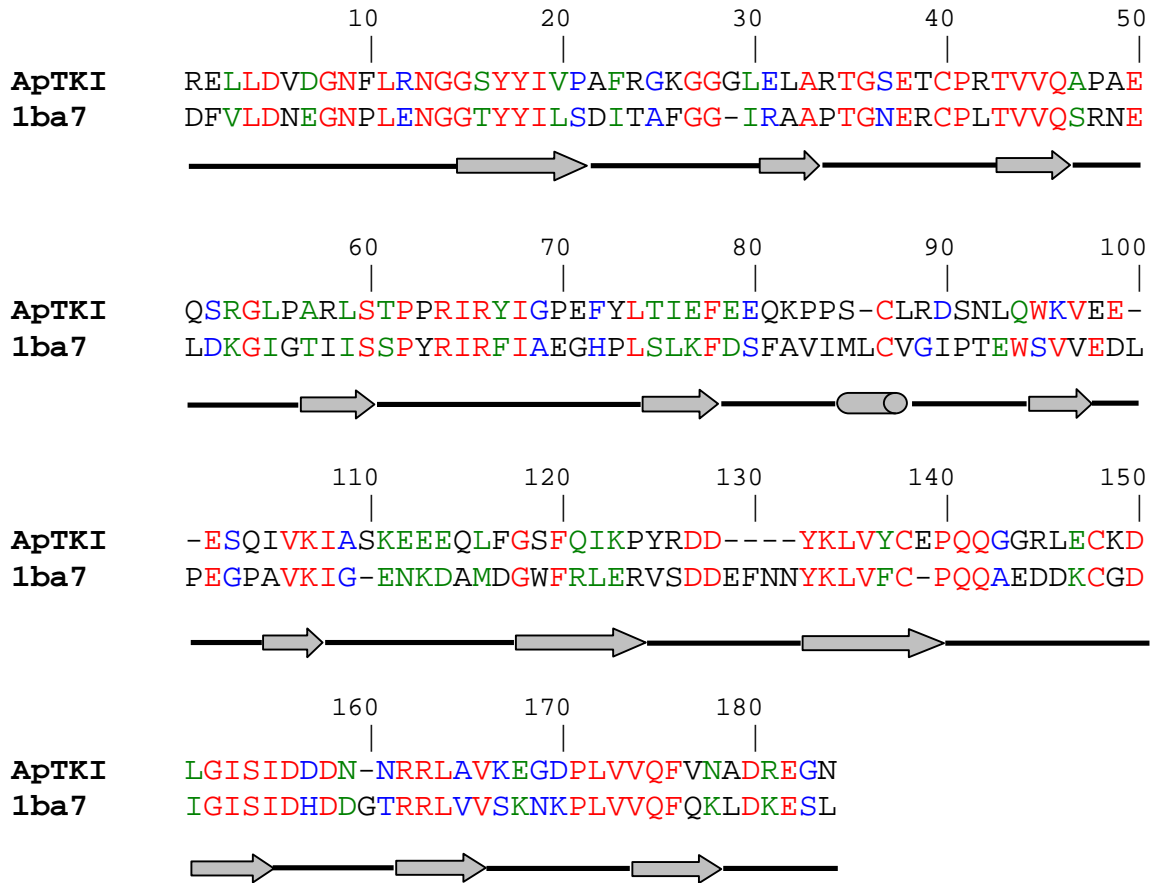


Figura 14. Alinhamento entre as seqüências dos inibidores do tipo Kunitz ApTKI e o molde 1ba7. A estrutura secundária do inibidor está representada por: setas, folha β , retas, alças e cilindro, alfa hélice. Regiões em vermelho compreendem os resíduos idênticos (40%); em azul, forte similaridade (18%); em verde fraca similaridade (12%).

c) Avaliação do modelo 3D de ApTKI

O modelo de ApTKI foi construído por modelagem comparativa utilizando o programa SWISS-MODEL, e sua estrutura resultante foi validada pelo programa PROCHECK que avalia diversos parâmetros estereoquímicos, tais como ângulos torsionais da cadeia principal (Φ e Ψ), ângulos torsionais das cadeias laterais, maus contatos (ou impedimentos estéricos), energias das ligações de hidrogênio, planaridade das ligações peptídicas, desvios em relação à geometria tetraédrica dos carbonos- α , dentre outros.

A avaliação do modelo apresentado pelo mapa de Ramachandran apresentou um modelo confiável com 98,6% dos resíduos presentes em regiões fisicamente aceitáveis do mapa (Figura 15). Desses 80,1% dos resíduos estavam situados na maioria em regiões de resíduos mais favoráveis, 14,4% estavam em regiões adicionalmente permitidas, 4,1% estavam em regiões generosamente permitidas e somente dois resíduos, Arg88 e Asp143, estavam em regiões desfavoráveis para a formação das estruturas secundárias em relação aos ângulos torsonais phi (Φ) e psi (Ψ), respectivamente (Figura 16).

O valor adquirido para o fator G, que é sempre referido como uma determinada resolução estrutural, na qual existe um valor médio de cada parâmetro associado à proteína envolvida na avaliação. No caso do ApTKI o total foi de $-0,26$, esse resultado demonstrou a normalidade da estrutura do modelo tridimensional, que foi obtido através do total de diferentes fatores G de cada resíduo de aminoácido (Figura 17).

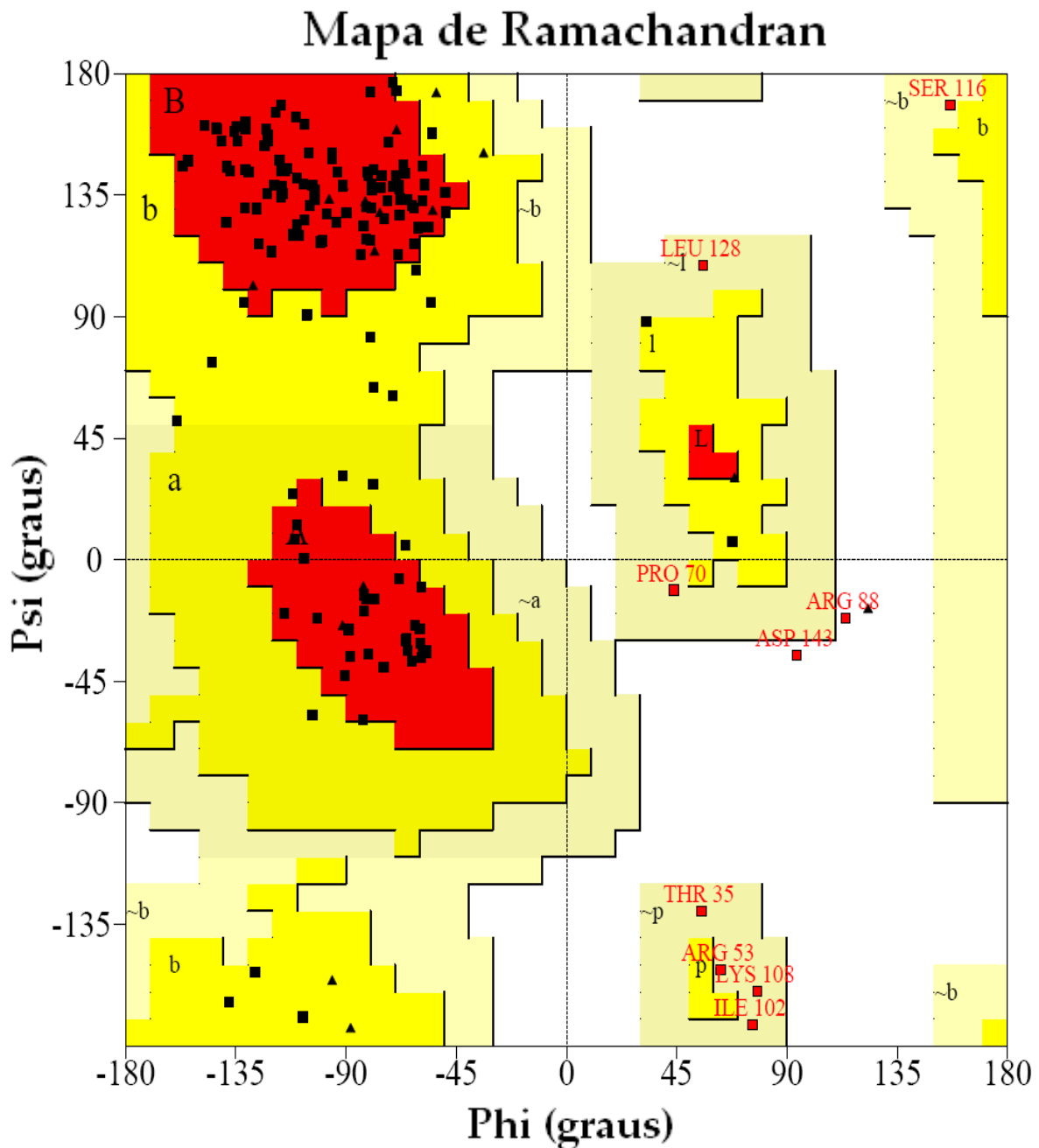


Figura 15 Mapa de Ramachandran, no qual estão mostradas as regiões fisicamente permitidas para os aminoácidos do modelo ApTKI. As regiões de estrutura secundária estão de acordo com: A – regiões de α hélices mais favoráveis; a – regiões de α hélices adicionalmente permitidas; ~a – regiões de α hélices generosamente permitidas; B – regiões de folhas β mais favoráveis; b – regiões de folhas β adicionalmente permitidas; ~b – regiões de folhas β generosamente permitidas; L – regiões de α hélices de mão esquerda mais favoráveis; l – regiões de α hélices de mão esquerda adicionalmente permitidas; ~l – regiões de α hélices de mão esquerda generosamente permitidas; p – regiões para glicina adicionalmente permitidas; ~p – regiões para glicina generosamente permitidas.

Mapa Estatístico		
Resíduos em regiões favoráveis [A,B,L]	117	80.1%
Resíduos em regiões aceitáveis [a,b,l,p]	21	14.4%
Resíduos em regiões generosamente aceitáveis [~a,~b,~l,~p]	6	4.1%
Resíduos em regiões desfavoráveis	2	1.4%
Número de resíduos sem glicina e sem prolina	146	100%
Número de resíduos finais (excl. Gly e Pro)	2	
Número de resíduos de glicina (mostrados como triângulos)	16	
Número de resíduos de prolina	12	
Número total de resíduos	176	

Figura 16. Resumo dos dados estatístico dos resíduos de aminoácidos situados no mapa de Ramachandran.

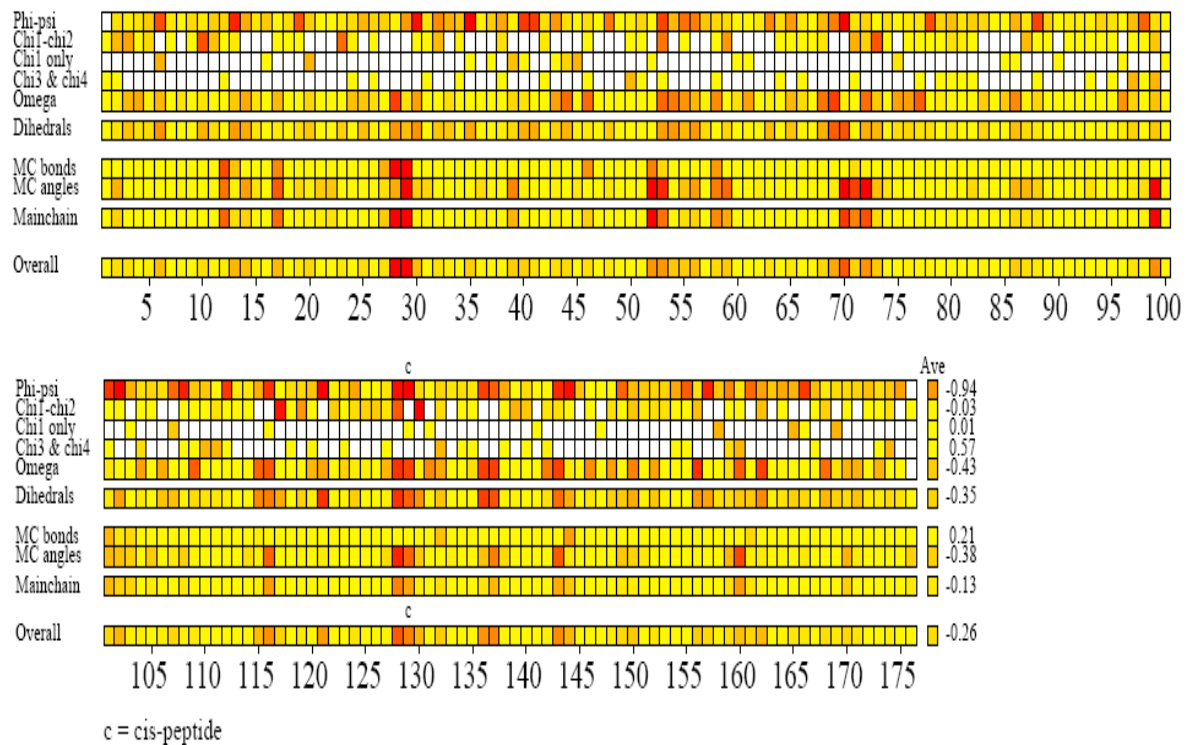
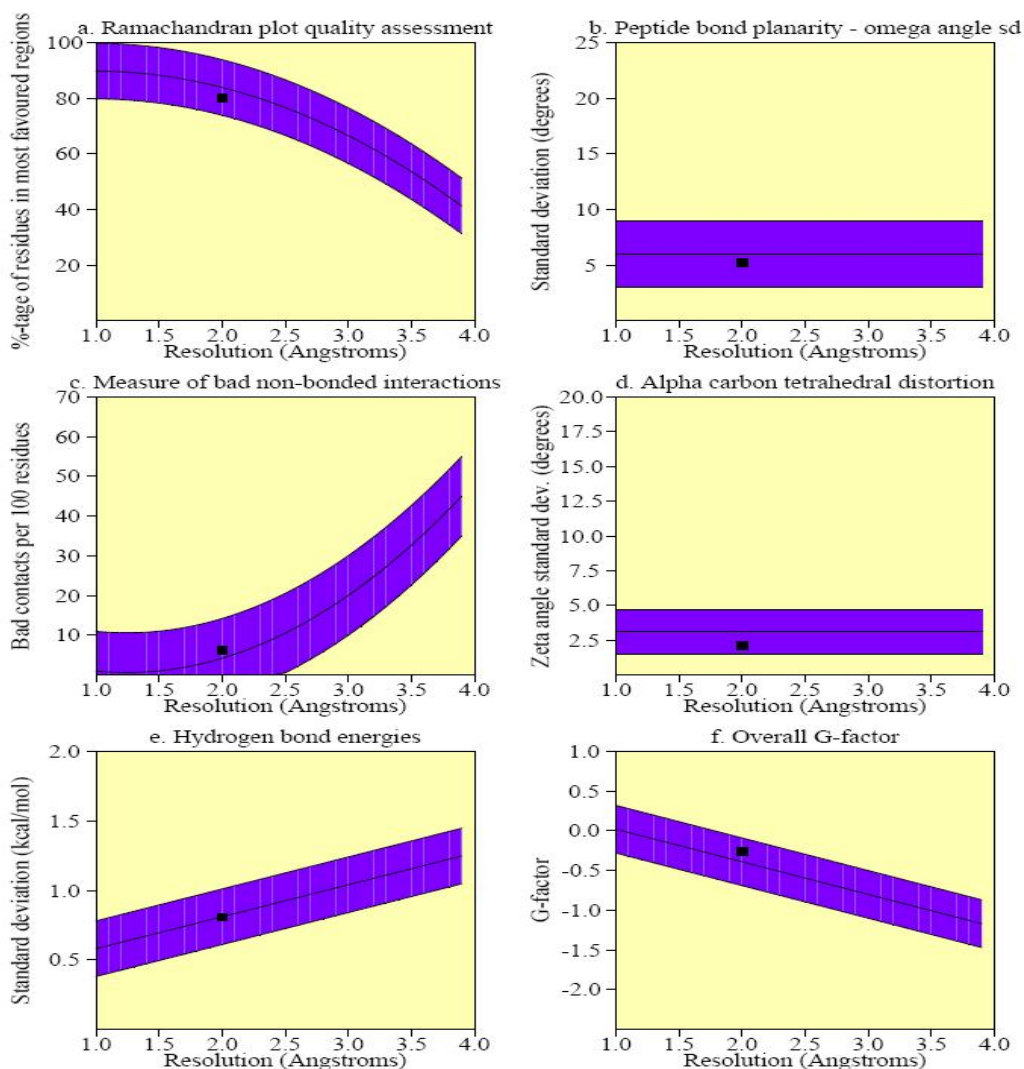


Figura 17. Análise dos diferentes parâmetros de fatores G do modelo ApTKI.

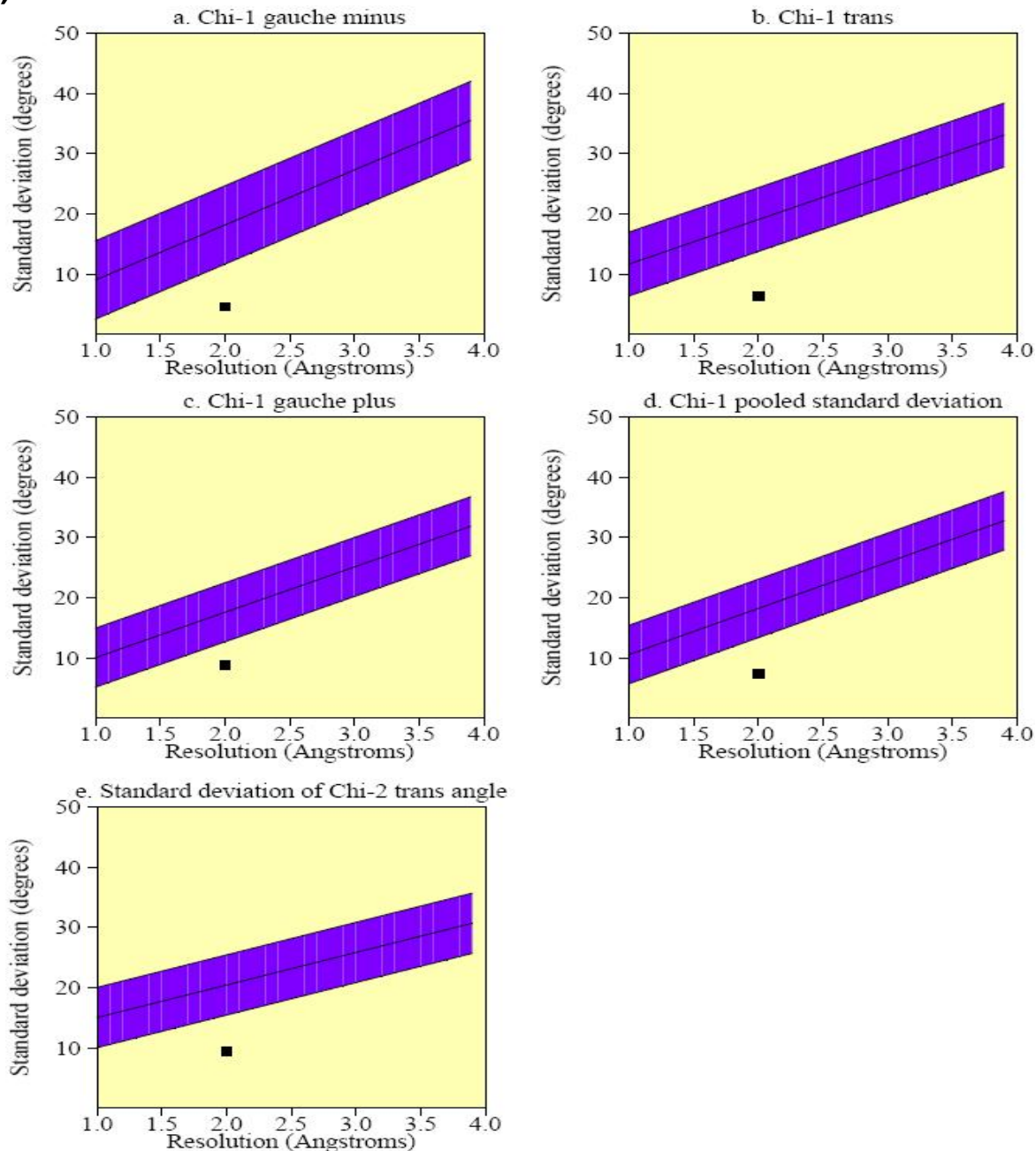
A estrutura da cadeia principal mostrou a qualidade do modelo estrutural comparada com estruturas bem refinadas já resolvidas. O resultado indicou que o modelo ApTKI construído apresentou seus resíduos de aminoácido dentro da média dos parâmetros observados. Por outro lado à estrutura da cadeia lateral foi considerada bem posicionada, quando comparada às estruturas experimentais com a mesma resolução, no caso uma resolução de 2.0Å (Figura18 A e B).

(A)



Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean	
			Typical value	Band width		
a. %-tage residues in A, B, L	146	80.1	83.8	10.0	-0.4	Inside
b. Omega angle st dev	174	5.2	6.0	3.0	-0.3	Inside
c. Bad contacts / 100 residues	11	6.2	4.2	10.0	0.2	Inside
d. Zeta angle st dev	160	2.1	3.1	1.6	-0.6	Inside
e. H-bond energy st dev	90	0.8	0.8	0.2	0.0	Inside
f. Overall G-factor	176	-0.3	-0.4	0.3	0.4	Inside

(B)



Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean	
			Typical value	Band width		
a. Chi-1 gauche minus st dev	30	4.5	18.1	6.5	-2.1	BETTER
b. Chi-1 trans st dev	42	6.3	19.0	5.3	-2.4	BETTER
c. Chi-1 gauche plus st dev	68	8.8	17.5	4.9	-1.8	BETTER
d. Chi-1 pooled st dev	140	7.4	18.2	4.8	-2.2	BETTER
e. Chi-2 trans st dev	48	9.4	20.4	5.0	-2.2	BETTER

Figura 18. Conjunto de gráficos mostrando o comportamento da estrutura ApTKI (representada pelos pequenos quadrados negros) comparado a estruturas bem refinadas em resolução similar (no caso 2.0Å), para a cadeia principal (A) e lateral (B).

A diferença entre a estrutura cristalizada do inibidor de soja (1ba7) e a estrutura do modelo ApTKI resultado de modelagem comparativa foram calculados pela sobreposição de ambas as estruturas (Figura 19). O valor de RMSD entre a estrutura resolvida por difração de raio-X e o modelo de ApTKI foi calculado através do carbono alfa e a cadeia principal resultando em 0.36Å. O valor de RMSD (raiz quadrada do desvio médio) que mede a acurácia do modelo (quando igual a zero indica um ajuste perfeito) indicou a pequena variabilidade entre o modelo ApTKI e a estrutura experimental (1ba7:inibidor de Kunitz de soja) que por consequência refletiu a forte similaridade no padrão de dobramento entre esses inibidores.

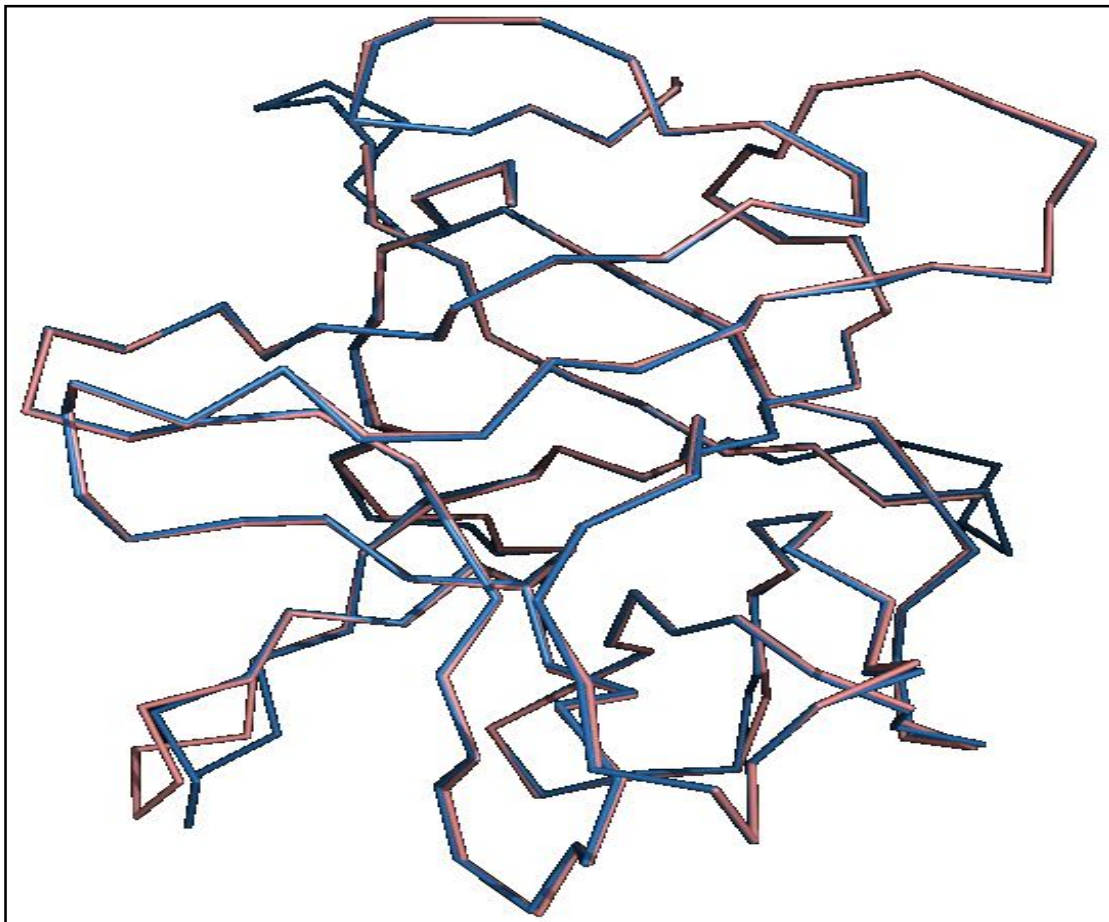


Figura 19. Sobreposição estrutural do modelo ApTKI (azul) com a estrutura experimental do inibidor de soja - 1ba7 (rosa). RMSD entre as duas estruturas foi somente 0.36Å.

4.3.2. MODELO DE ApTKI

O inibidor ApTKI após validação apresentou conformação estrutural similar ao dos inibidores de proteinase serínicas do tipo Kunitz. A conformação possui 12 folhas β conectadas por longas alças, que foram divididos em três subdomínios (azul, amarelo e vermelho), cada um com aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos e cada subdomínio consistindo de quatro folhas β antiparalelas. A organização estrutural do modelo apresentou a ordem A- β 1-A- β 2-A- β 3-A- β 4, onde “A” denota as alças que conectam as folhas β (Figura 20).

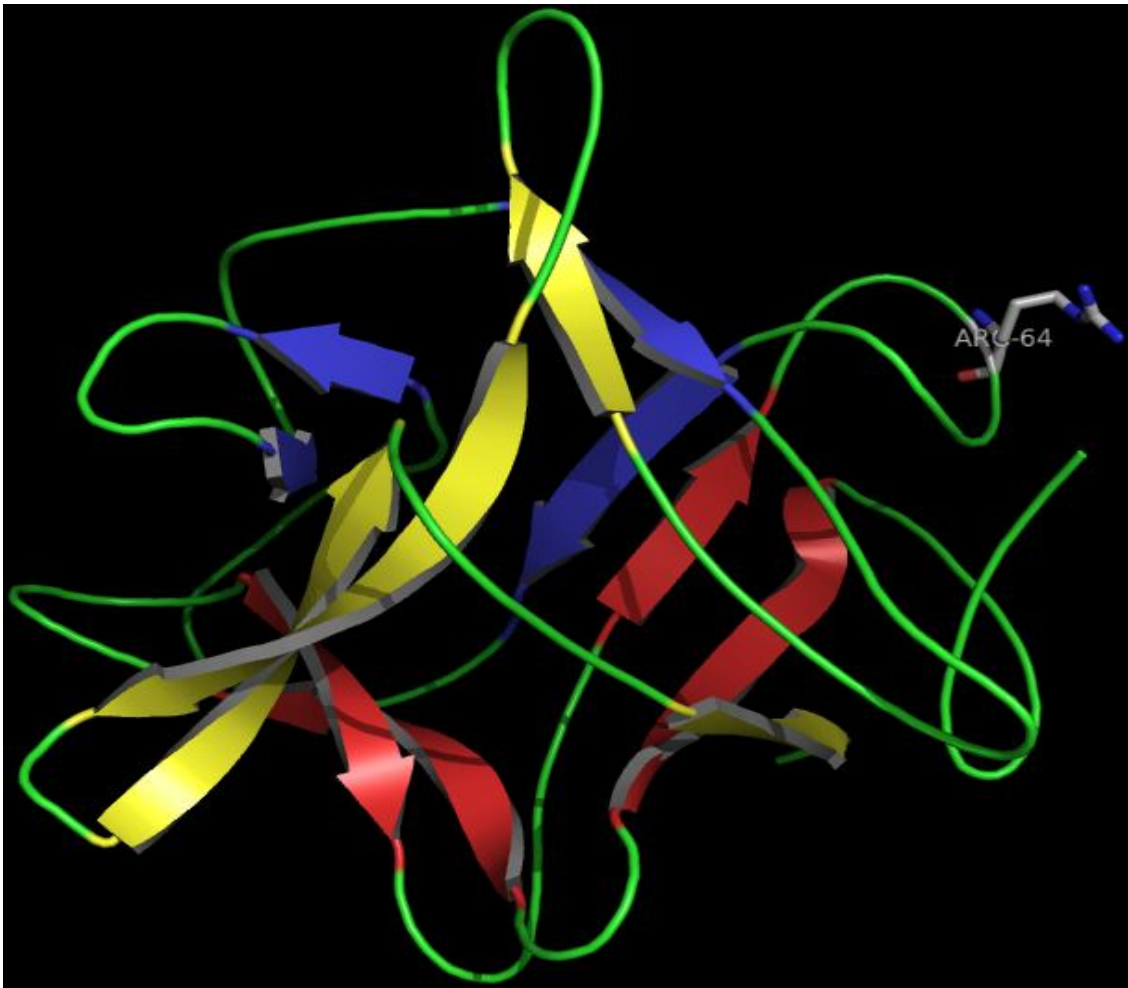


Figura 20. Modelo do inibidor tipo Kunitz de *A. pavonina* construído com o programa SWISS-MODEL. As folhas β antiparalelas se dividem em três subdomínios (azul, “A”, vermelho “B” e amarelo “C”) constituído de quatro folhas β , em verde são as alças e em roxo indicado pela seta o sitio reativo para tripsina conservados nos inibidores do tipo Kunitz.

Os elementos da estrutura secundária de ApTKI está representado na Tabela 7. O modelo demonstrou que as interações entre os diferentes subdomínios são mais fortes do que os contatos intra-subdomínios. As conformações β antiparalelas intra-subdomínio são estabilizadas pelos padrões básicos de pontes de hidrogênio.

Tabela 7. Distribuição da estrutura secundária de ApTKI.

Conformação β		Alças		Pontes Dissulfeto
		N-terminal	1-013	
A1	14-21	A1-A2	22-26	
A2	27-32	A2-A3	33-41	Cys40
A3	42-46	A3-A4	47-55	
A4	56-59	A4-B1	60-72	Sítio reativo
B1	73-77	B1-B2	78-93	Cys86
B2	94-96	B2-B3	97-103	
B3	104-106	B3-B4	107-115	
B4	116-119	B4-C1	120-133	Cys131
C1	134-137	C1-C2	138-145	Cys141
C2	146-153	C2-C3	154-157	
C3	157-163	C3-C4	164-170	
C4	171-175			

4.3.3 PADRÃO DE INTERAÇÃO *IN SILICO* ApTKI-TRIPSINA

O modelo refinado do inibidor ApTKI e a estrutura da enzima serínica tripsina (pdb: 1fn6) resolvido por difração de raio-X, foram utilizados para o estudo do mecanismo de acoplamento enzima-inibidor. O modelo de interação resultou no mecanismo de inibição do tipo não competitivo, o qual demonstrou uma pequena mudança conformacional na tríade catalítica observado pela sobreposição do inibidor livre e o inibidor complexado com a enzima alvo. O resíduo de aminoácido arginina (Arg64) na posição P1 do inibidor interagiu com o resíduo serina (Ser37) na posição S1 da tripsina formando uma ponte de hidrogênio (Figura 20).

4.3.4 GEOMETRIA DO SITIO REATIVO DO COMPLEXO *IN SILICO* ApTKI-TRIPSINA

A geometria do grupo carbonil da posição P1 do inibidor é de grande importância na formação da interação entre o inibidor e a proteinase durante a catálise. O carbono carbonil interage para formar uma ponte de hidrogênio com NH da Ser37 da tripsina no complexo ApTKI-Tripsina, a distância entre a Arg64 do inibidor e a Ser37 da enzima foi de 3,48Å. Outras pontes de hidrogênio foram formadas na ligação entre o inibidor e a proteinase estabilizando o complexo, o resíduo na posição P1 do inibidor interage com o resíduo de histidina (His40) da enzima com distância de 3,32Å, já o resíduo de isoleucina (Ile65) do inibidor na posição P2 também interage com o resíduo de histidina (His40) da enzima formando uma ponte de hidrogênio com distância de 3,39Å e o resíduo de arginina (Arg66) do inibidor na posição P3 formou uma ponte salina com o ácido aspártico (Asp74) da enzima com distância de 3,08Å. A alça reativa foi estabilizada intramolecularmente através de ligações polares do tipo ponte de hidrogênio entre o resíduo de asparagina (Asn13) e os resíduos de prolina (Pro62), arginina (Arg64) e isoleucina (Ile65), o que favoreceu a ligação à tripsina (Figura 21).

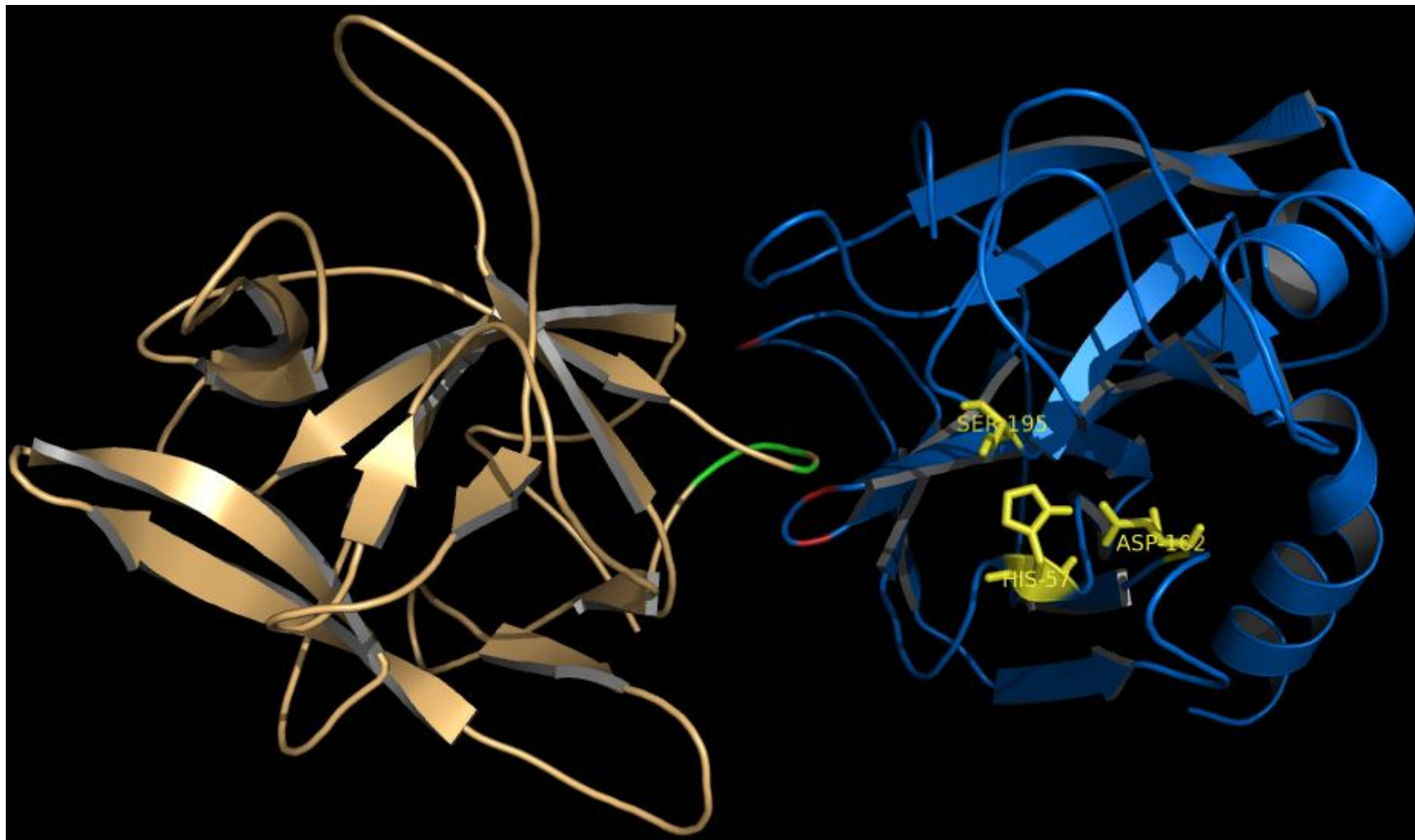


Figura 21. Visão geral da interação entre o modelo do inibidor ApTKI (marrom) e a tripsina (azul), destacando a alça reativa (verde) e os resíduos de aminoácido da enzima (vermelho). Os resíduos do sítio catalítico estão representado em amarelo na forma de bastão. O mecanismo de inibição apresentou ser do tipo não competitivo *in silico*.

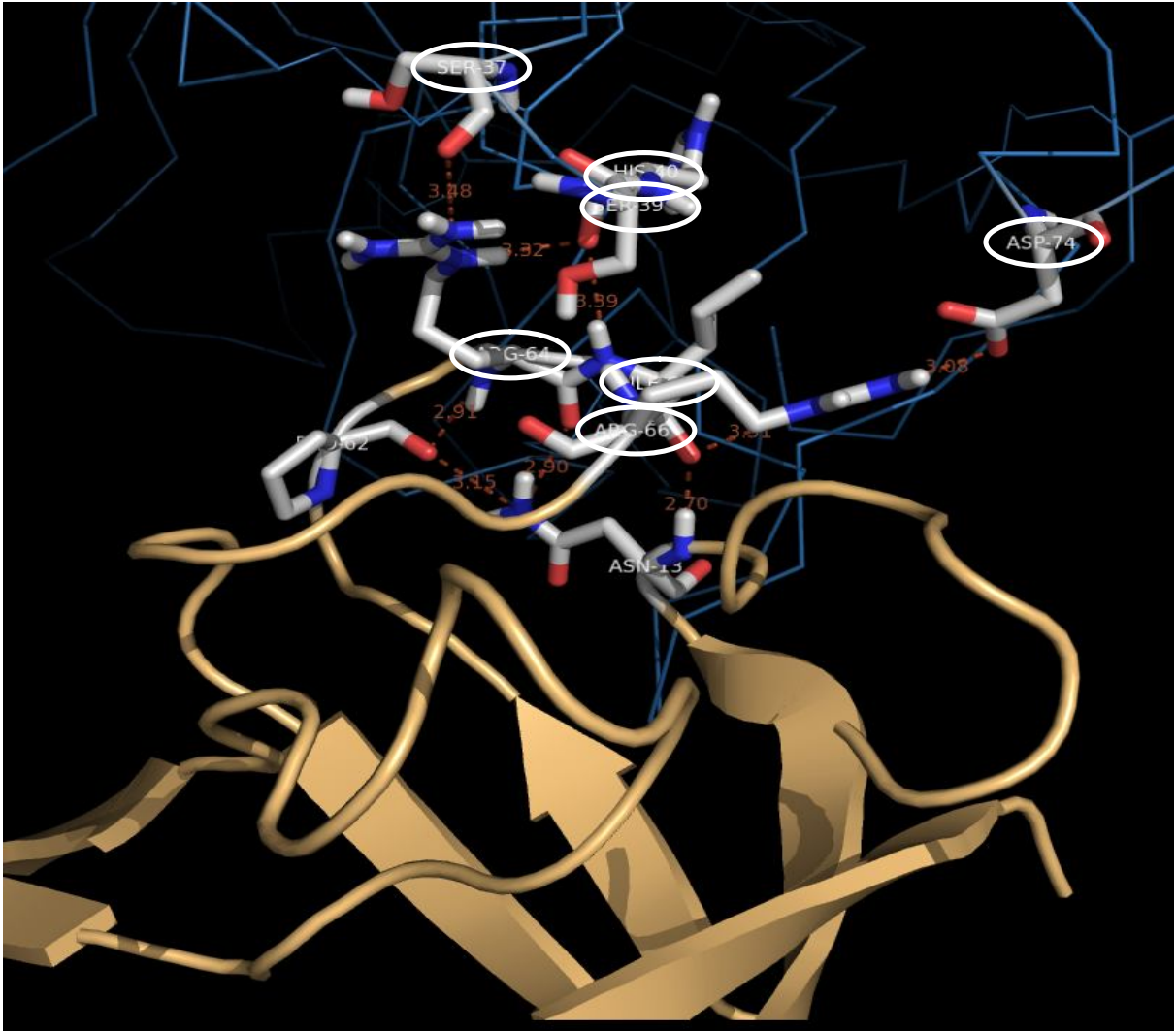


Figura 22. Visualização da formação do complexo entre o inibidor ApTKI (marrom) e a proteinase serínica tripsina (azul). A representação da interação é feita em bastão e bola mostrando a formação das pontes de hidrogênio, nos círculos estão mostrados os resíduos P1 (Arg64), P2 (Ile65) e P3 (Arg66) fazendo contato com os resíduos Ser37, Ser39, His40 e Asp74 da enzima.

4.3.5. PADRÃO DE INTERAÇÃO *IN SILICO* ApTKI-PAPAÍNA

O modelo do inibidor ApTKI e a enzima cisteínica papaína (9pap) resolvida por difração de raio-X, foram utilizados para a análise do mecanismo de interação enzima-inibidor. O inibidor apresentou um mecanismo de inibição do tipo não competitivo, esta interação proporcionou uma mudança conformacional no sítio catalítico devido a formação do complexo determinando a perda da atividade catalítica. O carbono carbonil do resíduo de ácido glutâmico (Glu109) interagiu para formar uma ponte salina com NH da lisina (Lys190) da proteinase cisteínica papaína (Figura 23).

4.3.6. GEOMETRIA DO SÍTIO REATIVO DO COMPLEXO *IN SILICO* ApTKI-PAPAÍNA

A formação do complexo entre o modelo ApTKI e a enzima papaína mostrou poucas interações. O complexo foi estabilizado por contatos do tipo ponte de hidrogênio intra e intercadeia. Os resíduos de ácido glutâmico (Glu38), serina (Ser85), ácido aspártico (Asp89), ácido glutâmico (Glu109) do inibidor ApTKI formaram uma região carregada negativamente devido à natureza química desses aminoácidos, com exceção da serina que é um aminoácido não carregado, mas polar. Os resíduos de aminoácido que fazem parte do sítio de interação da papaína foram os resíduos, valina (Val150), arginina (Arg188) e lisina (Lys190). A ponte de hidrogênio entre os resíduos Glu38 do inibidor e Arg188 da enzima foi formada através da ligação do oxigênio (OE1) e o hidrogênio (NH2) respectivamente; o resíduo Glu109 (carregado negativamente) do inibidor e Lys190 (carregado positivamente) da enzima forma uma ponte salina entre o oxigênio (OE1) e o nitrogênio (NZ) com distância de 3,37Å; a interação observada entre os resíduos de Ser85 do inibidor e Val150 da enzima proporcionou a formação de uma ponte de hidrogênio de 3,25 Å, por último foi observado uma interação hidrofóbica entre o resíduo Asp89 do inibidor e a Val150 da enzima (Figura 24).

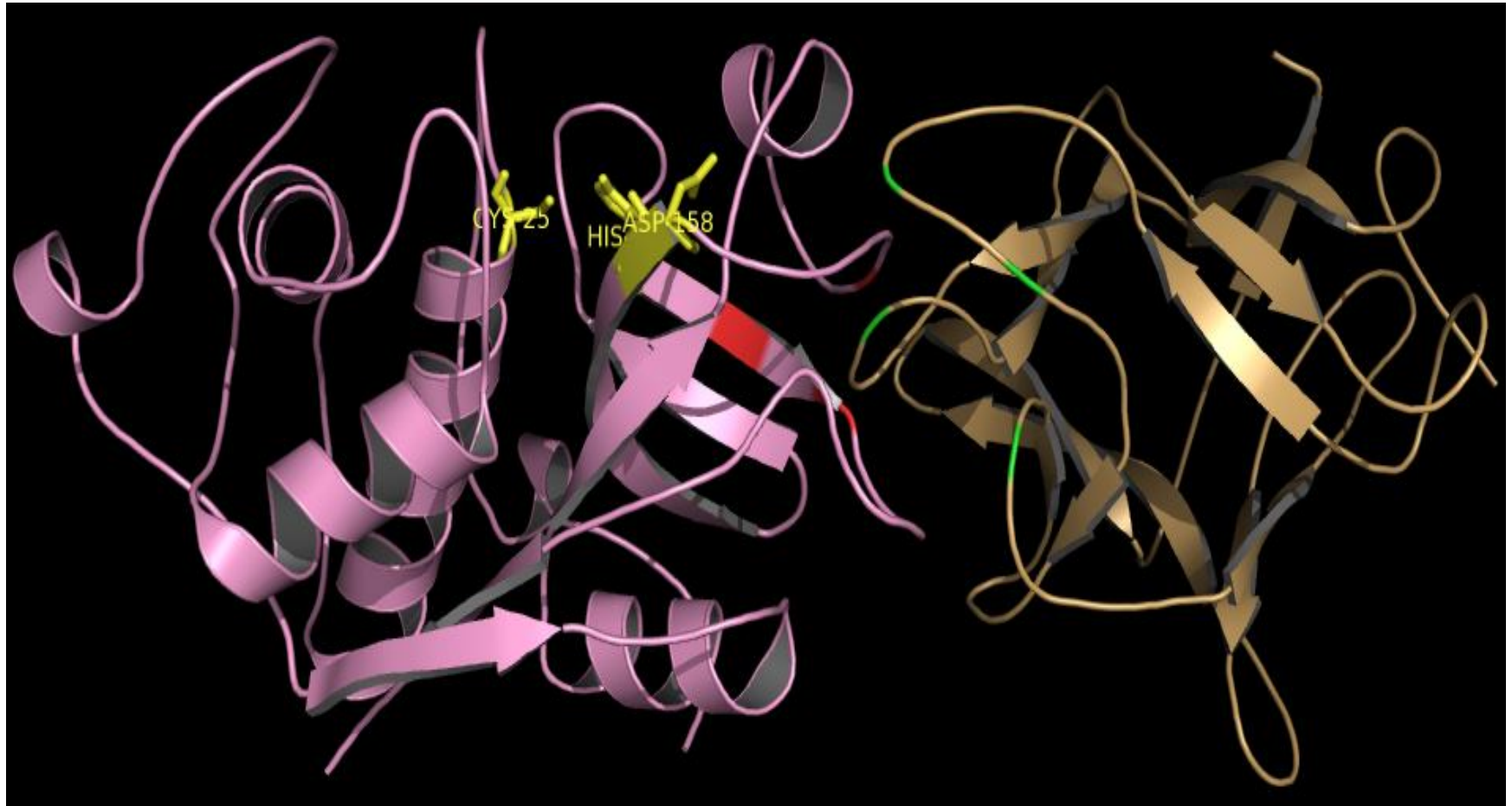


Figura 23. Visão geral da interação entre o modelo do inibidor ApTKI (marrom) e a papaína (roxo), destacando os resíduos do inibidor (verde) que interagem com os resíduos da enzima (vermelho). Os resíduos do sítio catalítico estão representado em amarelo na forma de bastão. O mecanismo de inibição apresentou ser do tipo não competitivo *in silico*.

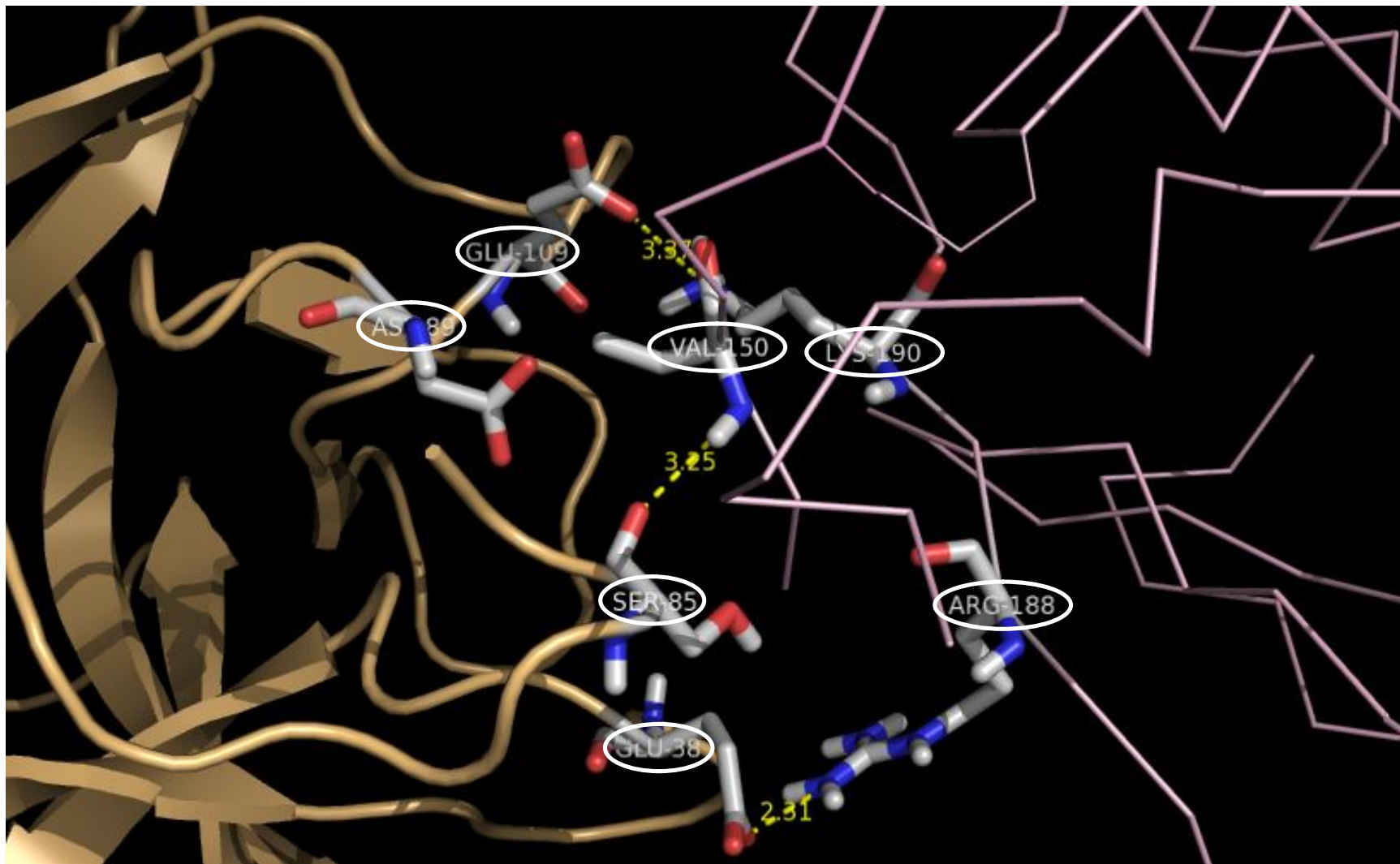


Figura 24. Visualização da formação do complexo entre o inibidor ApTKI (marrom) e a proteinase cisteínica papaína (roxo). A representação da interação é feita em bastão e bola mostrando a formação das pontes de hidrogênio e os contatos hidrofóbicos. Os círculos estão representando os resíduos Glu38, Ser85, Glu89 e Glu109 fazendo contato com os resíduos de Val150, Arg188 e Lys190 da enzima.

4.3.7. FORMAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO

O inibidor da semente de *A. pavonina*, interessante, forma com as proteinases serínicas e cisteínicas um complexo ternário que foi mostrado *in vitro* e comprovado *in silico* (Figura 25). Esse inibidor forma esse complexo ternário através de mecanismos não competitivos e foi capaz de inibir fortemente a tripsina e moderadamente a papaína, indicando que este inibidor é de fato um STI bifuncional.

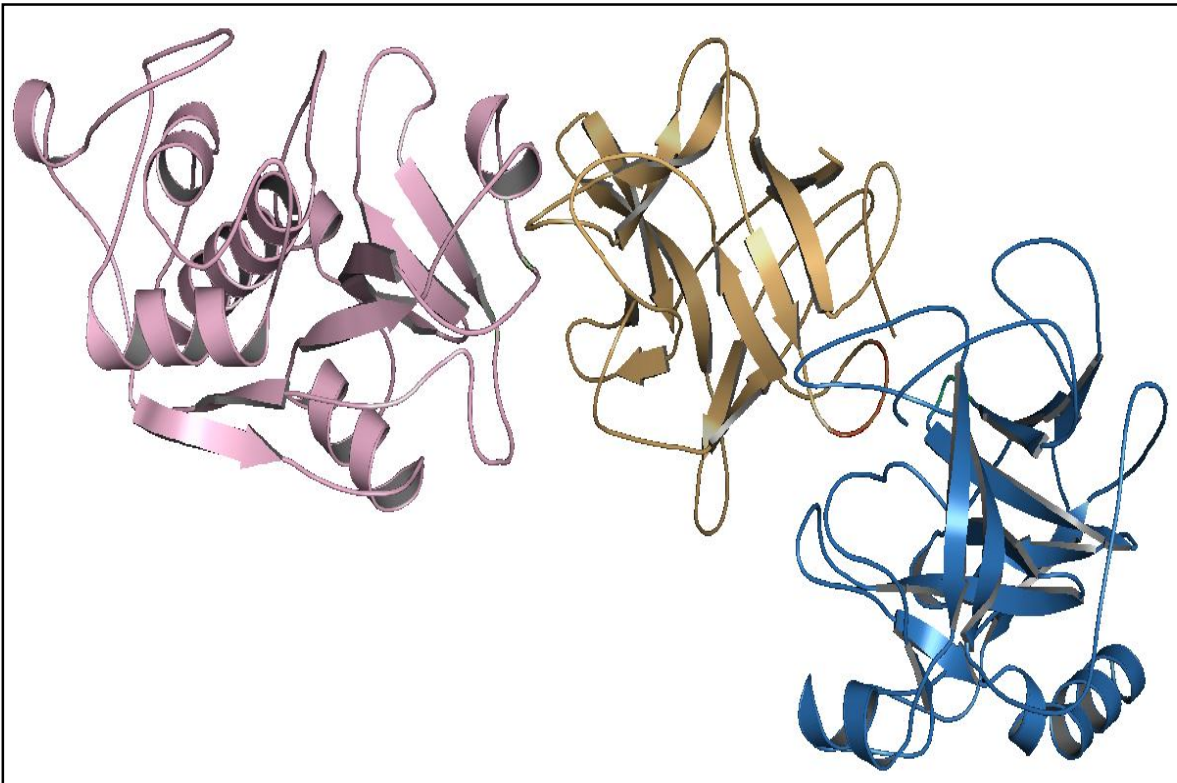


Figura 25. Visualização geral da formação do complexo ternário entre o inibidor Papaína–ApTKI–Tripsina. Papaína (rosa), ApTKI (marrom) e Tripsina (azul) e.

5 DISCUSSÃO

Inibidores de proteinases da família do tipo Kunitz são amplamente investigados sob os mais diversos aspectos, tais como: caracterização bioquímica, relacionamento filogenético, estrutura tridimensional e especificidade para diversas classes de enzimas (NORIOKA, et al., 1988; RYAN, 1990; JONGSMA; BOLTER, 1997; OLIVEIRA, et al., 2002; FRANCO, et al., 2002; KRAUCHENCO, et al., 2003; GARCIA, et al., 2004; BHATTACHARYYA, et al., 2007). Essa especificidade de inibição frente a diferentes enzimas de mesma classe mecanística tem sido extensivamente estudada (OLIVEIRA, et al., 2002; FRANCO, et al., 2002; MACEDO, et al., 2004; GOMES, et al., 2005; OLIVEIRA, et al., 2007). Usando a especificidade de inibição e o domínio STI, os inibidores do tipo Kunitz foram classificados por nós em inibidores STI clássicos (Kunitz que inibe somente uma enzima serínica) e STI duplos (Kunitz que inibem duas enzimas serínicas). Recentemente uma nova classe foi adicionada e denominada de STI bifuncional (Kunitz que inibem enzima serínica e cisteínica), nesta classe o primeiro inibidor purificado e caracterizado foi o da semente de *Prosopis juliflora* e sua interação bifuncional *in silico* também foi à primeira proposta (OLIVEIRA, et al., 2002; FRANCO, et al., 2002). Baseando-se nos resultados obtidos no estudo para *P. juliflora* e observando que este inibidor possuía alta similaridade com o inibidor de proteinase do tipo Kunitz da semente de *Adenantha pavonina* (ApTKI), Macedo e colaboradores (2004), mostraram *in vitro* que ApTKI também inibia a enzima papaína (proteinase cisteínica), propriedade que permitia a inclusão deste inibidor na classe de inibidores STI bifuncionais.

Por meio da análise das seqüências primárias e cruzando com os dados de especificidade *in vitro* foi construída uma árvore filogenética para se observar a distribuição desta característica bifuncional sendo geral ou residindo em alguma subfamília das leguminosas. Para isso, 15 seqüências aminoacídicas completas de inibidores da família do tipo Kunitz disponíveis no banco de dados NCBI foram usadas na construção de uma árvore filogenética não enraizada. Esta árvore apresentou valores de bootstrap acima de 50% suportados por cem (100) réplicas. A análise da distribuição filogenética dos 15 inibidores da família do tipo Kunitz em leguminosas

demonstrou que as seqüências ficaram nitidamente agrupadas nas classes de especificidade, onde os inibidores STI clássicos formaram dois grupos, um composto pelos inibidores da subfamília Papilionideae e outro constituído pelos inibidores da subfamília Caesalpinoideae. A especificidade para inibir duas proteinases de mesma classe mecanística, STI duplo, foi observado na subfamília Mimosoideae entre os inibidores das sementes de *A. confusa*, *L. leucocephala* e *E. contortisiliquum* e em um único inibidor na subfamília Papilionideae, o inibidor da semente de *Glycine max*, que apresenta alto grau de identidade com os inibidores da subfamília Mimosoideae. Os inibidores da classe STI bifuncional formaram um grupo bem definido, *P. juliflora* e *A. pavonina*, ambos pertencentes à subfamília Mimosoideae.

Os inibidores da classe STI bifuncional adquiriram esta característica possivelmente devido à pressão biótica de insetos predadores que apresentavam proteinases de classes diferentes (CHRISTELLER, et al., 2005) para digerirem as proteínas da dieta. Para contrapor esta característica dos predadores, as plantas possivelmente desenvolveram durante sua co-evolução com as pragas, inibidores capazes de serem ativos contra as diferentes classes de proteinases desses insetos (XAVIER-FILHO, 1992). Os inibidores de proteinase das sementes da subfamília Mimosoideae, *Prosopis juliflora* (OLIVEIRA, et al., 2002), *Adenantha pavonina* (MACEDO, et al., 2004), *Pithecellobium dumosum* (OLIVEIRA, et al., 2007) são exemplos de inibidores que possuem a capacidade de inibir enzimas de classes mecanísticas diferentes. Essa história co-evolutiva, entre insetos predadores e inibidores de proteinases, foi bem relatada nos últimos anos por Jongsma *et al.* (1997); Rawlings *et al.* (2004); Lopes *et al.* (2004).

A interação *in vitro* e *in silico* dos inibidores bifuncionais tem sido alvo de investigação, pois estes inibidores são excelentes candidatos nos processos de transgenia e também nos estudos de especificidade enzima:inibidor (ZENKE, et al., 1991; FURTADO, et al., 2003). O ApTKI, ao lado do inibidor de *P. juliflora* (PjTKI), até então são os únicos representantes STI bifuncionais com suas seqüências completas e apenas PjTKI teve seu modelo de interação *in silico* resolvido. Neste estudo foi feita a avaliação da interação *in vitro* e *in silico* de ApTKI frente as enzimas tripsina e papaína.

Para isso ApTKI foi purificado segundo a metodologia desenvolvida por Macedo et al., (2004) e usado nos ensaios *in vitro*.

O ApTKI purificado foi capaz de suprimir a atividade proteolítica da tripsina em 97%, e foi menos efetivo para a proteinase cisteínica papaína suprimindo sua atividade em 48%, dado similar ao observado na purificação do mesmo inibidor por Macedo et al. (2004) que atingiu 52% de inibição. Outros inibidores de sementes de leguminosas apresentaram essa característica bifuncional similar, como os purificados da semente da *P. juliflora* que suprimiu a atividade catalítica da papaína em 65% (FRANCO, et al., 2002), *Crotalaria pallida*, que suprimiu atividade da papaína em 43,9% (GOMES, et al., 2005a) e os inibidores de *Pithecellobium dumosum* que apresentaram efeito sobre a papaína variando entre 32% a 49% (OLIVEIRA, et al., 2007). O inibidor ApTKI é efetivo contra tripsina através do mecanismo de inibição do tipo não competitivo, mecanismo esse menos comum para inibidores do tipo Kunitz. O resultado, portanto está de acordo com relatos mostrados para outras leguminosas como *Crotalaria pallida* (GOMES, et al., 2005a) e *Tamarindus indica* (ARAÚJO, et al., 2005a) e esse mecanismo também pode ser visto em inibidores de tripsina purificados de tubérculos de *Colocasia esculenta* (OLIVEIRA, 2001) e *C. antiquorum* (SUMAHI; PATTABIRAMAN, 1979) que inibem não competitivamente a atividade catalítica da tripsina. Macedo et al. (2004) observou que o inibidor ApTKI foi capaz de suprimir a atividade proteolítica da proteinase cisteínica papaína de forma não competitiva. Esse resultado é freqüentemente encontrado para fitocistatinas, inibidores específicos de enzimas cisteínicas (ABE, et al., 1987; 1994; FERNANDES, et al., 1991; ZHAO, et al., 1996; PERNAS, et al., 1998; JACINTO, et al., 1998; HAARD, 2000; OLIVEIRA, et al., 2002; MACEDO, et al., 2004; OLIVEIRA, et al., 2007).

Na análise *in silico* da interação de APTKI com as enzimas alvos, a construção do modelo tridimensional de ApTKI mostrou que este apresentou 12 folhas betas, antiparalelas conectadas por longas alças formando um barril beta. Essa característica é encontrada nos inibidores tipo Kunitz, tais como, *Glycine max*, *Delonix regia*, *Erythrina caffra*, *Copaifera langsdorffii*, *Psophocarpus tetragonolobus* os quais possuem suas estruturas resolvidas por técnicas experimentais como difração de raio-X. Por esta razão esses inibidores são chamados de inibidores da família beta (SONG; SUH, 1998;

BATISTA, et al., 2001; KRAUCHENCO, 2003, 2004; KHAMRUI, et al., 2005). O resultado para a validação do modelo tridimensional de ApTKI realizado pelo programa PROCHECK e confirmado pelo mapa de Ramachandran mostrou que o modelo apresentava 98,6% dos resíduos de aminoácido em regiões fisicamente aceitáveis, com 80,1% dos resíduos situados em regiões mais favoráveis, 14,4% estão em regiões adicionalmente permitidas, 4,1% estão em regiões generosamente permitidas e somente dois resíduos um de arginina e outro de ácido aspártico (Arg88 e Asp143) encontram-se em regiões desfavoráveis para a formação das estruturas secundárias em relação aos ângulos torsionais phi e psi. Esse resultado esta de acordo com encontrado para outro inibidor de proteinase do tipo Kunitz *L. leucocephala* da mesma subfamília, construído pelo método de modelagem por homologia e avaliado pelo PROCHECK. A análise do mapa de Ramachandran apresentou um total de 99,4% dos resíduos de aminoácido em regiões fisicamente aceitáveis, com 81,3% dos resíduos situados em regiões mais favoráveis, 13,2% estão em regiões adicionalmente permitidas, 4,9% estão em regiões generosamente permitidas e somente o resíduo treonina (Thr98) encontra-se em região desfavorável. A sobreposição estrutural entre o inibidor ApTKI e o inibidor de soja (1ba7) apresentou valor de RMSD igual a 0.36Å. O resultado obtido é menor do que o observado para o modelo construído por modelagem comparativa do inibidor de *L. leucocephala* que apresentou valores de RMSD para os cristais de STI:PPT (orto e tetragonal) entre 0,58 e 0,47Å. Os resultados do mapa de Ramachandran, do valor de RMSD, dos parâmetros de cadeia principal e lateral de ApTKI demonstraram que o modelo do inibidor é aceitável e que a qualidade estereoquímica e a forte similaridade no padrão de dobramento é semelhante a aqueles encontrados entre os inibidores da família Kunitz (SATTAR, et al., 2004).

Além do mais, na construção do modelo ApTKI o resultado do fator G foi de -0,26 um valor aproximado do valor também encontrado para o modelo de *P. juliflora* que apresentou valor total do fator G entre -0,23 e -0,29 para os modelos construídos com moldes variando entre 83 a 91% dos resíduos em regiões fisicamente aceitáveis no mapa de Ramachandran (FRANCO, et al., 2002).

Os modelos 3D de interação de ApTKI com as enzimas demonstraram que ApTKI formou um complexo com a tripsina de acordo com o mecanismo de inibição do

tipo não competitivo, comprovando os resultados de Prabhu; Pattabiraman (1980) e Macedo et al. (2004). O inibidor ApTKI interagiu com a tripsina em uma região favorável diferente do sitio catalítico. O sitio catalítico ficou exposto perdendo sua atividade enzimática possivelmente pela mudança conformacional, torção dos resíduos da tríade promovidos pela interação com o inibidor.

A formação de pontes de hidrogênio na interação frente à proteinase serínica apresentou dois contatos polares de distâncias 3,32 e 3,48Å entre o P1 (Arg64) do inibidor e os resíduos de Ser37 e His40 da enzima. Os resíduos dos sítios P2 do inibidor (Ile65) forma com a histidina (His40) da enzima uma ponte de hidrogênio com distância de 3,39Å e entre o resíduo P3 do inibidor (Arg66) e o resíduo de ácido aspártico da enzima (Asp74) uma outra ponte de hidrogênio com distância de 3,08Å. Essas distâncias são similares as encontradas para a formação do complexo LTI:PPT do inibidor de *L. leucocephala* a qual apresenta distância entre o P1 (Arg62) e a Ser195 com valor de 2,76 e 2,71Å para os modelos construídos com as estruturas cristalizadas do inibidor de soja orto e tetragonal respectivamente (SONG; SUH, 1998; SATTAR, et al., 2004). Essa interação menos comum no inibidor de *A. pavonina* entre a Arg64 e Ser37 contrasta com os resultados observados na maioria dos inibidores tipo Kunitz que formam o complexo enzima-inibidor através dos resíduos de Arg64 (P1) e Ser195 (S1) da tríade catalítica (HUBER, et al., 1974; MARQUART, et al., 1983; BODE; HUBER, 1992; SATTAR, et al., 2004). Iwanaga et al. (2004) relataram uma característica dos inibidores de proteinase tipo Kunitz, o resíduo de asparagina (Asn13) é conservada e possui um papel fundamental na atividade inibitória formando pontes de hidrogênio intracadeia com os resíduos da alça reativa. O modelo de ApTKI apresentou esse resíduo de aminoácido asparagina conservado. A asparagina (Asn13) no modelo ApTKI apresentou na estrutura terciária a formação de pontes de hidrogênio com os resíduos do sitio reativo P1 (oxigênio da Arg64), P2 (oxigênio da Ile65) e formação um contato polar entre o nitrogênio da asparagina e o oxigênio da prolina (Pro62) P2'. Outro resultado semelhante pode ser observado para o inibidor de quimotripsina de *Psophocarpus tetragonolobus*, um inibidor da subfamília Papilionoideae da divisão STI clássico, que apresenta o resíduo de asparagina (Asn14) possuindo uma função

importante na estabilidade e conformação da alça do sítio reativo (RAVICHANDRAN, 2001).

Os resultados observados *in vitro* indicaram que ApTKI inibe papaína e o sítio de interação para tripsina não impedia a interação com a papaína, portanto os sítios não estavam sobrepostos. Esse resultado foi diferente daquele encontrado na interação do inibidor de *P. juliflora* o qual possui o sítio reativo sobreposto para papaína e tripsina (FRANCO, et al., 2002). O mecanismo de inibição resultante *in silico* foi do tipo não competitivo corroborando o resultado *in vitro* e aquele encontrado por Macedo et al. (2004). A atividade do inibidor frente à papaína foi menor do que aquele encontrado para PjTKI, o que poderia ser explicado devido a mudanças nos resíduos envolvidos na interação com a papaína, onde somente o resíduo de ácido glutâmico (Glu109) foi conservado, quando comparado com a seqüência dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação de PjTKI:papaína. Entretanto o resíduo de ácido glutâmico (Glu89) foi substituído por ácido aspártico (Asp89) mantendo dessa maneira a natureza aminoacídica (aminoácidos ácidos), o que poderia favorecer também a interação de ApTKI com a papaína. Quando comparado o sítio de interação do PjTKI:papaína foi constatado que ApTKI apresentou em seu sítio de interação os resíduos de Glu109 e Asp89 envolvidos na ligação a papaína, e a presença de outros dois novos resíduos (Glu38 e Ser85) também foram importantes para estabilizar a formação do complexo. Outra diferença observada foi que no modelo de interação de *P. juliflora* (PjTKI) os sítios de interação estavam sobrepostos (FRANCO, et al., 2002) e no caso de ApTKI:papaína foram mostrados por análise *in vitro* e *in silico* que os sítios não estavam sobrepostos. Também, possivelmente a falta do resíduo aromático triptofano (Trp60) posicionado no centro da ligação entre a papaína e o inibidor ApTKI justifica a moderada eficiência da atividade inibitória, pois diferentemente do observado na interação entre o complexo PjTKI:papaína, a qual possui alta especificidade para a proteinase cisteínica, foi observado interação hidrofóbica através dos resíduos triptofano (Trp60) do inibidor e as cadeias laterais dos resíduos de triptofano (Trp69), tirosina (Tyr67) e arginina (Arg59) da papaína (FRANCO, et al., 2002).

Os inibidores de proteinase da Família do Tipo Kunitz apresentam alto grau de conservação tanto na seqüência primária quanto na estrutura tridimensional. Os

estudos através da metodologia modelagem comparativa, realizados para os inibidores das sementes de *P. juliflora* e *A. pavonina* proporcionaram interessantes informações sobre esses inibidores, igualmente adquirido através dos modelos resolvidos por metodologias experimentais. A família das leguminosas, mais precisamente a Subfamília Mimosoideae apresentam alto grau de identidade entre as seqüências primárias, e por este motivo provavelmente outros inibidores dessa subfamília apresentam na estrutura terciária uma informação valiosa sobre esta característica de inibir classes diferentes de proteinases. Os inibidores do tipo Kunitz das sementes de *E. contorsiliquum* e *A. confusa* provavelmente sejam fortes candidatos para o estudo de análise conformacional do mecanismo de inibição destes inibidores.

6 CONCLUSÃO

O inibidor ApTKI tipo Kunitz da semente de *A. pavonina*, apresentou sua estrutura tridimensional confiável, após a validações.

O inibidor ApTKI demonstrou ser um eficiente inibidor frente à proteinase serínica tripsina *in vitro*, inibindo essa proteinase de forma não competitiva reforçando *in silico*, e portanto esses dados estão de acordo com o encontrado por Prabhu; Pattabiraman, 1980.

A atividade inibitória do inibidor ApTKI sobre a proteinase cisteínica papaína foi moderada demonstrada *in vitro*, apresentando pouca similaridade entre os resíduos de interação exibidos pelo inibidor da semente de *P. juliflora*. ApTKI suprimiu a atividade catalítica da papaína, através do mecanismo de inibição do tipo não competitivo *in silico*, comprovando os resultados observados por Macedo *et al.* 2004.

Os sítios de interação do inibidor ApTKI não são sobrepostos como visto em *P. juliflora* por FRANCO, et al., 2002, e esse inibidor, tem a capacidade de formar um complexo ternário visto *in vitro* e *in silico*. Portanto, esse inibidor tem a interessante e exclusiva habilidade de interagir com duas proteinases, serínica (tripsina) e cisteínica (papaína); podendo contribuir dessa forma no desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas, para deter a atividade de enzimas digestivas alvos de insetos pragas.

Os estudos *in silico* e *in vitro* do inibidor ApTKI sobre as enzimas alvos puderam elucidar a especificidade de ligação desse inibidor bifuncional e, assim propor um candidato no modelo de pirimidilização de proteínas de defesa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; KONDO, H.; ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.51, n1, 2763–2768, 1987.

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin: molecular cloning and expression studies. **FEBS Letters**. 209, 932–937, 1992.

ABE, J.I.; SIDENIUS, U.; SVENSON, B. Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochemical Journal**. 293, 151-155, 1993.

ABE, M.; ABE, K.; IWABUCHI, K.; DOMOTO, C.; ARAI, S. Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. **Journal of Biochemistry**. 116, 488–492, 1994.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215 403-410, 1990.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHENG, Z., MILER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST – A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. 25:3389-3402, 1997.

ARAÚJO, C.J.; BEZERRA, I.W.L.; OLIVEIRA, A.S.; MOURA, F.T.; MACEDO, L.L.P.; GOMES, C.E.M.; BARBOSA, A.E.A.D.; MACEDO, F.P.; SOUZA, T.M.S.; FRANCO, O.L.; BLOCH-JR, C.; SALES, M.P. *In vivo* bioinsecticidal activity toward *Ceratitidis capitata* (fruitfly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *in vitro* bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. 53: 4381-4387, 2005.

ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., AND SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**. 22,195-201, 2006.

ARY, M.B.; RICHARDSON, M.; SHEWRY, P.R. Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears (*Coix lachrymal-jobi*). **Biochimica et Biophysica Acta**. 913, 260-266, 1989.

ASCENZI, P., RUOPPOLO, M., AMORESANO, A., PUCCI, P., CONSONNI, R., ZETTA, L., PASCARELLA, S., BORTOLOTTI, F., MENEGATTI, E. Characterization of low-molecular-mass trypsin isoinhibitors from oil-rape (*Brassica napus* var. *oleifera*) seed. **Eur. J. Biochem**. 261 (1), 275-284, 1999.

BATISTA, I.F.C.; OLIVA, M.L.V.; ARAUJO, M.S.; SAMPAIO, U.M.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C.A.M. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contorsiliquum* seeds. **Phytochemistry**. 41, 1017-1022, 1996.

BAYAT, A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. **Biological Molecular Journal**. 324:1018-1022, 2002.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**. 28 235-242, 2000.

BHAT, A. V.; PATTABIRAMAN, T. N. Protease inhibitors from jackfruit seed (*Artocarpus integrifolia*). **Journal of Bioscience**. 14 (4), 351-365, 1989.

BHATTACHARYYA, A.; MZUMDAR, S.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. A Kunitz proteinases inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**. 67, 232-241, 2006.

BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 145 669-677, 2007.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**. 204, 433-451, 1992.

BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinases-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1477, 241-252, 2000.

BOLTER, C., JONGSMA, M.A. The adaptation of insect to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. 43(10), 885-895, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 218-254, 1976.

BRODWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinases inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. 43, 855-874, 1997.

BRZIN, J.; KRDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. 13, 421-467, 1995.

BRZIN, J.; POPOVIC, T.; RITONJA, A.; PUIZDAR, V.; KIDRIC, M. Related cystatin inhibitors from leaf and from seed of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Science**. 138, 17–26, 1998.

CHRISTELLER, J.T. Evolutionary mechanism acting on proteinase inhibitor variability. **FEBS Journal**. 272, 5710-5722, 2005.

CRUZ-SILVA, I; GOZZO, A. J; NUNES, V. A; CARMONA, A. K; FALJONI-ALARIO, A; OLIVA, M. L. V; SAMPAIO, U. M; SAMPAIO, C. A. M; ARAÚJO, M. S. A proteinase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-Brail) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIa. **Biological Chemistry**. 385, 1083-1086, 2004.

DAYLER, C.S.A.; MENDES, P.A.M.; PRATES, M.V.; BLOCH JR, C.; FRANCO, O.L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Identification of a novel bean α -amylase inhibitor with chitinolytic activity. **FEBS Letters**. 579, 5616-5620, 2005.

DE LEO, F.; GALLERANI, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 32, 489-496, 2002.

DELGADO-VARGAS, F; LÓPEZ-VALDÉS, H. E; VALDES-RODRIGUEZ, S; BLANCO-LABRA, A; CHAGOLLA-LOPEZ, A; LOPEZ-VALENZUELA, E. J. Isolation and properties of a Kunitz-type protein inhibitor obtained from *Pithecellobium dulce* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52, 6115-6121, 2004.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**. 39:783-791, 1985.

FERNANDES, K. V. S.; SABELLI, P. A.; BARRATT, D. H. P.; RICHARDSON, M.; XAVIER-FILHO, J.; SHEWRY, P. R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase-inhibitors. **Plant Molecular Biology**. 23, 215–219, 1993.

FRANCO, L.O.; GROSSI DE SÁ, M.; SALES, M.P.; MELLO, V.L.; OIVEIRA, A.S., RIGDEN, D.J. Overlapping Binding Sites for Trypsin and Papain on a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from *Prosopis juliflora*. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**. 49:335–341, 2002.

FRANCO, O.L.; DIAS, S.C.; MAGALHÃES, C.P.; MONTEIRO, A.C.S.; BLOCH-JR,C.; MELO, F.R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**. 65, 81-89, 2004.

FURTADO A., HENRY R.J., SCOTT K., MEECH S. The promoter of the *asi* gene directs expression in the maternal tissues of the seed in transgenic barley. **Plant Molecular Biology**. 52: 787–799, 2003.

GADDOUR, K.; VICENTE-CARBAJOSAC, C. J.; LARAC, P.; ISABEL-LAMONEDA, I.; DIAZ, I.; CARBONERO, P. A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli. **Plant Molecular Biology**. 45, 599–608, 2001.

GARCIA, V. L; FREIRE, G. M; NOVELLO, J. C; MARANGONI, S; MACEDO, M. L. R. Trypsin inhibitor from *Poecilantha parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest protease. **The Protein Journal**. 23, 343-350, 2004.

GUEx, N. AND PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. **Electrophoresis**. 18: 2714-2723, 1997.

GOMES, C.E.M.; BARBOSA, E.A.D.; MACEDO, L.L.P.; PITANGA, J.C.M.; MOURA, F.T.; OLIVEIRA, A.S.; MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.S.; MACEDO, F.P.; ANDRADE, L.B.S.; VIDAL, M.S.; SALES, M.P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochememistry**. 46, 1095-1102, 2005a.

GOMES, A. P. G.; SIMONI C. DIAS, S. C.; CARLOS BLOCH JR., C.; MELO, F. R.; FURTADO JR, J. R.; MONNERAT, R. G.; MARIA F. GROSSI-DE-SA, M. F.; FRANCO, O. L. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**. 140, 313–319, 2005b.

GRÜTTER, M.G., FENDRICH, G., HUBER, R., BODE, W. **EMBO J**. 7, 345-351, 1988.

HEIBGES, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. Functional comparison of homologous membranes of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). **Molecular Genetic and Genomics**. 269, 535-541, 2003.

HIRASHIKI, I.; OGATA, F.; YOSHIDA, N.; MAKISUMI, S.; ITO, A. Purification and complex formation analysis of a cysteine proteinase inhibitor (cystatin) from seeds of *Wisteria floribunda*. **Journal of Biochemistry**. 108, 604-608, 1990.

HUBER, R., KUKLA, D., BODE, W., SCHWAGER, P., BARTELS, K., DEISENHOFER., J., STEIGEMANN, W. **Journal Molecular. Biology**. **89, 73-101**, 1974.

HUNG, C-H; LEE, M-C; LIN, J-Y. Inactivation of *Acacia confusa* trypsin inhibitor by site-specific mutagenesis. **FEBS Letters**. 353, 312-314, 1994.

IWANAGA, S.; YAMASAKI, N.; KIMURA, M.; KOUZUMA, Y. Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of kunitz-type protease inhibitors from plants. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 69 (1), 220-223, 2005.

JACINTO, T.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, C. L. Leaves of transgenic tomato plants overexpressing prosystemin accumulate high levels of cystatin. **Plant Science**. 138, 35–42, 1998.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. 43 (10), 885-895, 1997.

JOSHI, B. N.; SAINANI, M. N.; BASTAWADE, K. B.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 246, 382– 387, 1998.

KHAMRUI, S.; DASGUPTA, J.; DATTAGUPTA, J.; SEN, U. Single mutation at P1 of a chymotrypsin inhibitor changes it to a trypsin inhibitor: X-ray structural (2.15Å) and biochemical basis. **Biochemica et Biophysica Acta**. 1752, 65-72, 2005.

KIM, J. Y.; CHUNG, Y. S.; PAEK, Y. I.; KIM, J. K.; YU, S. N.; OH, B. J.; SHIN, J. S. Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization. **Molecules and Cells**. 31 (9), 392-397, 1999.

KIMURA, K.; IKEDA, T.; FUKUMOTO, D.; YAMASAKI, N.; YONEKURA, M. Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 59, 2328–2329, 1995.

KOIDE, T.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors: Amino acid sequence of the carboxyl-terminal region and the complete amino acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). **European Journal of Biochemistry**. 32, 417-431, 1973.

KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**. 2, 379-384, 1997.

KOPP J. AND SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. **Nucleic Acids Research**. 32, D230-D234, 2004.

KORTT, A. A.; JERMYN, M. A. Acacia proteinase inhibitors. Purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed. **European journal of biochemistry**. 115, 551-557, 1981.

KOUZUMA, Y.; KAWANO, K.; KIMURA, M.; YAMASAKI, N.; KADOWAKI, T.; YAMAMOTO, K. Purification, characterization and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, *Sca* and *Scb*, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Journal of Biochemistry**. 119, 1106–1113, 1996.

KRAUCHENCO, S.; NAGEM, R.A.P.; SILVA, J.A.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. **Biochemistry**. 86, 167-172, 2004.

KRAUCHENCO, S.; PANDO, S.C.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 312, 1303-1308, 2003.

LASKOWSKI, M.JR.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review Biochemistry**. 49:593-626, 1980.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; THORNTON, J.M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. 26 283-291, 1993.

LASKOWSKI, M.JR.; QASIM, M.A.; LU, S.M. Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteinase. In **Protein-Protein Recognition (Kleanthous, C., ed.)**, Oxford University Press, Oxford. pp. 228-279, 2003.

LAWRENCE, J. C.; NIELSEN, S. S. Partial isolation and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 1020-1025, 2001.

LAWRENCE, P.L.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phyto phagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**. 5 (1), 93-109, 2002.

LENARCIC, B.; RITONJA, A.; DOLENC, I.; STOKA, V.; BERBIC, S.; PUNGERCAR, J.; STRUKELJ, B.; TURK, V. Pig leukocyte cysteine proteinase inhibitor (PLCPI), a new member of the stefin family. **FEBS Letter**. 336(2): 289-292, 1993.

LEVLEVA, E. V.; RUDENSKAYA, Y. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; MOSOLOV, V. V. A 7.5-kD inhibitor of cysteine proteinases from pumpkin seeds. **Biochemistry**. 62, 551-644, 1997.

LIAO, H.; REN, W.; KANG, Z.; JIANG, J-H.; ZHAO, X-J.; DU, L-F. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. **Biotechnology letters**. 29 (4), 653-658, 2007.

LIN, J. Y; CHU, S. C; WU, H. C; HSICH, Y. S. Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confuse*. **Journal of Biochemistry**. 110, 879-883, 1991.

LOPES, A.R.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; TERRA, W.R. Coevolution of Insect Trypsins and Inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 55:140–152, 2004.

MACEDO, M. L. R.; MATOS, D. G. G.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**. 54, 553-558, 2000.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; CABRINI, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1621, 170-182, 2003.

MACEDO, M.L.R.; SA, C.M.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P. A Kunitz-type inhibitor of Coleopteran proteases isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds its effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52:2533-2540, 2004.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Ingra laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**. 68, 1104-111, 2007.

MANDAL, S.; KUNDU, P.; ROY, B.; MANDAL, R. K. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**. 277, 37161-37168, 2002.

MARQUART, M., WALTER, J., DEISENHOFER, J., BODE, W., HUBER, R. The geometry of the reactive site and of the peptide group in trypsin, trypsinogen and its complex with inhibitor. **Acta Crystallography**. B, 39, 480-490, 1983.

MEESTER, P. D.; BRICK, P., LLOYD, L. F., BLOW, D. M. ONESTI, S. Structure of the Kunitz type trypsin inhibitor (STI): implication for the interactions between members of the family and tissue plasminogen activator. **Acta Crystallographica**. 54, 589-597, 1998.

MELLO, G. C; OLIVA, M. L. V; SUMIKAWA, J. T; MACHADO, O. L. T; MARANGONI, S; NOVELLO, J. C; MACEDO, M. L. R Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. **Journal of Protein Chemistry**. 20, 625-632, 2002.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon, R. J. & Bond, J. S. (ed.), *Proteolytic enzymes: A practical approach*. New York, Oxford University Press, 1, 1-14, 1996.

MISAKA, T.; KURODA, M.; IWABUCHI, K.; ABE, K.; ARAI, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. **European Journal of Biochemistry**. 240, 614–690, 1996.

MUNDY, J., SVENDSEN, I., HEJGAARD, J. Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization. **Carlsberg Res Commun**. 48:81-91, 1983.

MURKHOPADHYAY, D. The Molecular Evolutionary History of a Winged Bean α -Chymotrypsin Inhibitor and Modeling of Its Mutations Through Structural Analyses. **Journal of Molecular Evolution**. 50:214–223, 2000.

NEGREIROS, A.N., CARVALHO, M.M.M., XAVIER-FILHO, J., BLANCO-LABRA, A., SHEWRY, P.R., RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from seeds of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**. 30:2829-2833, 1991.

NORIOKA, N., HARA, S., IKENAKA, T., ABE, J. Distribution of the Kunitz and Bowman-Birk family proteinase inhibitor in leguminosae seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**. 52:1245-1252, 1988.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends in Biochemical Sciences**. 14:268-271, 1989.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon, R.J. & Bond J.S. (ed), *Proteolytic Enzymes: A Practical approach*. New York, Oxford University Press, 1, 1-14, 1996.

ODANI, S.; YOKOKAWA, Y.; TAKEDA, H.; A. B. E, S.; ODANI, S. The primary structure and characterization of carbohydrate chains of the extracellular glycoproteinase inhibitor from látex of *Carica papaya*. **European Journal of Biochemistry**. 241, 70-82, 1996.

OJIMA, A.; SHIOTA, H.; HIGASHI, K.; KAMADA, H.; SHIMMA, Y.; WADA, M.; SATOH, S. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell culture and seeds of carrot. **Plant Molecular Biology**. 34, 99–109, 1997.

OLIVA, M. L. V; SOUZA-PINTO, J. C; BATISTA, I. F. C; ARAÚJO, M. S; SILVEIRA, V. F; AUERSWALD, E. A; MENTELE, R; ECKERSKORN, C; SAMPAIO, U. M; SAMPAIO, C. A. M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1477, 64-74, 2000.

OLIVA, M. L.; MENDES, C. R.; SANTOMAURO-VAZ, E. M.; JULIANO, M. A.; MENTELE, R.; AUERSALD, E. A.; SAMPAIO, U. M.; SAMAPAIO, C. A. *Bauhinia bauhinoides* plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. **Current Medicinal Chemistry**. 8, 977-984, 2001.

OLIVEIRA, C. M. **Isolamento e caracterização parcial de inibidores de tripsina e quimotripsina de tubérculos de *Colocasia esculenta***. Natal, 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001.

OLIVEIRA, A.S.; PEREIRA, R.A.; LIMA, L.M.; ANA H.A.; MORAIS, A.H.A.; MELO, F.R.; FRANCO, O.L.; BLOCH JR., C.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; SALES, M.P. Activity toward Bruchid Pest of a Kunitz-Type Inhibitor from Seeds of the Algaroba Tree (*Prosopis juliflora* D.C.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 72, 122-132, 2002.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S. SALES, M. P. Identification of a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* Seeds with Insecticidal Properties and Double Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55, 7342-7349, 2007.

ORENGO, C.A., JONES, D.T. & THORNTON, J.M. Protein superfamilies and domain superfolds. **Nature** (London). 372:631-634, 1994.

RYAN, C.A. Protease inhibitor in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. 28, 425-449, 1991.

PANDO, S. C; OLIVA, M. L. V; SAMPAIO, C. A. M; DI CIERO, L; NOVELLO, J. C; MARANGONI, S. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. **Phytochemistry**. 57, 625-631, 2001.

PERLSTEIN, S.H.; KEZDY, F.J. Isolation and characterization of a protease inhibitor from commercial stem bromelain acetone powder. **Journal of Supramolecular Structure**. 1 (3), 249-254, 1973.

PERNAS, M.; SANCHEZ-MONGE, R.; GÓMEZ, L.; SALCEDO, G. A. Chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. **Plant Molecular Biology**. 38, 1235–1242, 1998.

PRABHU, K. S.; PATTABIRAMAN, T. N. Natural plant enzyme inhibitors. Isolation and characterization of a trypsin/chymotrypsin inhibitor from Indian red wood (*Adenanthera pavonina*) seeds. **Journal Science Food Agricultural**. 31, 967-980, 1980.

RAMACHANDRAN, G.N.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Adv. Protein Chem**. 23, 283-437, 1968.

RAVICHANDRAN, S., DASGUPTA, J., CHAKRABARTI, C., GHOSH, S., SINGH, M., DATTAGUPTA, J.K. The role of Asn14 in the stability and conformation of the reactive-site loop of winged bean chymotrypsin inhibitor: crystal structures of two point mutants Asn14 – Lys and Asn14 – Asp. **Protein Engineering**. Vol. 14, nº 5, pp. 349-357, 2001.

RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P., BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemistry. J**. 378, 705-716, 2004.

RICHARDSON, M; CAMPOS, F. A. P; XAVIER-FILHO, J; MACEDO, M. L. R; MAIA, G. M. C; YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian Carolina tree (*Adenanthera pavonina*). **Biochimica et Biophysica Acta**. 872, 134-140, 1986.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: Methods in plants Biochemistry. **New York, Ademic Press**. 5, 259-305. 1991.

RITONJA, A.; KRIZAJ, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKELJ. B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE. D.J.; BARRET, A.J.; TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Letters**. 504, 41-44, 1990.

RODENBURG, K.W.; VARALLYAY, E.; SVENDSON, I.; SVENDSON, B. Arg-27, arg127 and arg-155 in the α -trefoil protein barley α -amylase/subtilisin inhibitor are interface

residues in the complex with barley α -amylase. **Biochemical Journal**. 309, 969-976, 1995.

ROGEL, J. B.; POPOVIC, T.; RITONJA, A.; STRUKELJ, B.; BRZIN, J. Chelidocystatin, a novel phytocystatin from *Chelidonium majus*. **Phytochemistry**. 49 (6), 1645-1649, 1998.

RYAN C.A. Proteinase inhibitors, in: A. Marcus (Ed.), **Biochemistry of Plants**, Academic Press. New York. Vol. 6, 351-370, 1981.

RYAN C.A. Protease inhibitors in plants-genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** 28, 425-449, 1990.

RYAN, S. N.; LAING, W. A.; MCMANUS, M. T. A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. **Phytochemistry**. 38 (3), 846-852, 1998.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**. 234, 779-815, 1993.

SALI, A. 100,000 protein structures for the biologist. **Nature Structural & Molecular Biology**. 05, 1029-1032, 1998.

SATTAR, R.; ALI, S.A.; KAMAL, M.; KHAN, A.A.; ABBASI, A. Molecular mechanism of enzyme inhibition: prediction of the three-dimensional structure of dimeric trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* by homology modelling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 314, 755-765, 2004.

SCHIMOLER-OROURKE, R.; RICHARDSON, M.; SELITRENNIKOFF, C.P. Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(5), 2365-2366, 2001.

SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, AND PEITSCH M.C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**. 31: 3381-3385, 2003.

SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**. 16, 168-175, 1998.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. In: Callow, J. (ed.). **Advances in Botanical Research**. 26, 136-192, 1997.

SHEE, C; SHARMA, A. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from seeds of *Murraya koenigii*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. 22 (1), 115-120, 2007.

SONG, H.K.; SUH, S.W. Kunitz type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue type plasminogen activator. **Journal of Molecular Biology**. 275, 347-363, 1998.

SONG, I.; TAYLOR, M.; BAKER, K.; BATEMAN, R. C. Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. **Gene**. 162, 221–224, 1995.

STROBL, S.; MASKOS, K.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RUTH, F.X.; GLOCKSHUBER, R. A novel strategy for inhibition of α -amylase in complex with the *Ragi* bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. **Structure**. 6, 911-921, 1998.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. 1999.

SUMIKAWA, J. T.; NAKAHATA, A. M.; FRITZ, H.; MENTELE, R.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. A Kunitz-type glycosylated elastase inhibitor with one disulfide bridge. **Planta Medica**. 72, 393-397, 2006.

TELES, R. C. L.; SOUZA, E. M. T.; CALDERON, L. A.; FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**. 65, 793-799, 2004.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**. 22, 4673-4680, 1994.

TSCHECHE, H. Biochemistry of natural proteinase inhibitors. **Angew. Int. Edn. Engl**. 13:10-28, 1974.

VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; KLADNITSKAYA, G. V.; MOSLOV, V. V. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and Phytophthora-infected potato tubers. **FEBS Letters**. 426, 131-134, 1998.

VALUEVA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Proteins inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure and properties. **Russ. J. Plant. Physiol.** 46:307-321, 1999.

VALUEVA, T.A.; REVINA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Reactive sites of a 21KDa protein inhibitor of serine proteinases from potato tubers. **Biochemistry**. 64, 1074-1078, 1999.

WALDRON, C.; WEGRICH, L. M.; MERLO, P. A. O.; WALSCH, T .A. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Molecular Biology**. 23, 801–812, 1993.

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. **Organização dos Estados Americanos-OEA**. 1993. 1-31.

XAVIER-FILHO, J. The Biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 4, 1-6, 1992.

YAMAGATA, H.; KUNIMATSU, K.; KAMASAKA, H.; KURAMOTO, T.; IWASAKI, T. Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 62, 978-985, 1998.

ZENKE, K.J.; MULLER-FAHRNOW, A.; JANY, M. D.; PAL, G.P.; SAENGER, W. The three-dimensional structure of the bifunctional proteinase K/ α -amylase inhibitor from wheat (PKI3) a 2.5Å resolution. **FEBS Letter**. 279, 240-242, 1991.

ZHAO, Y.; BOTELLA, M. A.; SUBRAMANIAN, L.; NIU, X.; NIELSEN, S. S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. **Plant Physiology**. 111, 1299–1306, 1996.