



Fundação Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Caracterização química de inibidores de serino proteases
isoladas a partir da secreção cutânea de *Pithecopus
(Phyllomedusa) azureus* (Amphibia, Anura,
Phyllomedusidae).**

Ana Carolina Martins Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Brasília, 2017



Fundação Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Caracterização química de inibidores de serino proteases
isoladas a partir da secreção cutânea de *Pithecopus
(Phyllomedusa) azureus* (Amphibia, Anura,
Phyllomedusidae).**

Ana Carolina Martins Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília, 2017

Agradecimentos

Aos meus pais pelo inesgotável incentivo e toda a ajuda que têm me dado todos esses anos.

Agradeço ao meu orientador e amigo professor Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior pelo incentivo, apoio, investimento, paciência e por tudo que aprendi sobre o trabalho e sobre a vida.

À professora Mariana Castro pela colaboração, incentivo e atenção dispensada ao nosso trabalho.

À professora Sonia Freitas cuja experiência e apoio nortearam todo nosso trabalho.

À professora Eliane Noronha pela eterna paciência e todo auxílio com a cinética.

Aos professores da UFRJ Rafael Melani e Gilberto Domont por me receberem no laboratório e todo auxílio com o sequenciamento *de novo*.

Aos meus queridos amigos Tânia e Carlos pelos ensinamentos e mesas redondas de discussões muito proveitosas.

Aos meus demais amigos Andreia, Lucas, João e Manuela que sempre me motivaram e não me deixaram desanimar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, A Universidade de Brasília, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que de perto ou de longe incentivaram este trabalho, muito obrigada!

Aos meus amigos e familiares, dedico.

“A frase ‘a pessoa se fez sozinha’ não existe, carece de veracidade. Todos nós somos feitos por milhares de pessoas. Cada ser que fez algo de bom para nós, ou nos disse algumas palavras de conforto ou aprovação, influenciou em nossa personalidade e nossos atos. É por isso que elas se transformam em parte de qualquer sucesso nosso.”

George Matthew Adams

Resumo

A família Phyllomedusidae se destaca entre os anfíbios por ser uma rica fonte de peptídeos antimicrobianos (PAMs), e esses peptídeos estão agrupadas em famílias de acordo com a similaridade: Dermaseptinas, Phylloseptinas, Plasticininas, Dermatoxinas e Phylloxinas. Além dos peptídeos antimicrobianos, existe outra classe de peptídeos importantes como os inibidores de proteases, que atuam ligando-se às proteases impedindo a sua função, e inativando-as. A secreção cutânea de *Pithecopus (Phyllomedusa) azureus* tem sido bastante investigada no que diz respeito à presença de compostos antimicrobianos, no entanto pouco se sabe a respeito de outras classes de moléculas presentes na secreção deste animal. Neste trabalho foi isolado um inibidor de tripsina a partir da secreção cutânea de *P. azureus*. Os resultados apresentaram um potente inibidor de tripsina ($K_i=1\text{nM}$), e inibição do tipo competitiva, que apresenta alta similaridade com PSKP-I de *P. sauvagii*. Esta proteína foi isolada e caracterizada por HPLC em duas etapas e sequenciamento *de novo*. A massa molecular do componente principal foi estabelecida por LC-MS/MS como 5898 Da. Além disso, este inibidor se mostrou bastante estável em diversos pHs e temperaturas apesar de perder atividade mesmo em baixas concentrações de DTT; no entanto, não apresentou atividade hemaglutinante ou antitumoral nas concentrações testadas. Este novo inibidor isolado a partir da secreção cutânea de um anfíbio amplia o conhecimento a respeito desta rica fonte de compostos com amplo potencial biotecnológico.

Palavras-chave: *Pithecopus azureus*, inibidor do tio Kazal, caracterização química, inibidor de tripsina.

Abstract

The Phyllomedusidae family stands out among amphibians as a rich source of antimicrobial peptides (AMPs), and these peptides are grouped into families according to similarity: Dermaseptins, Phylloseptins, Plasmininins, Dermatoxins and Phyllotoxins. In addition to antimicrobial peptides, there is another class of important peptides, such as protease inhibitors, that act by binding to proteases, preventing their function, and inactivating them. The cutaneous secretion of *Pithecopus (Phyllomedusa) azureus* has been well investigated with respect to the presence of antimicrobial compounds, however little is known about other classes of molecules present in the secretion of this animal. In this work, a trypsin inhibitor was isolated from cutaneous secretion of *P. azureus*. The results showed a potent inhibitor of trypsin ($K_i = 1\text{nM}$), and a competitive inhibition type, which shows high similarity with PSKP-I of *P. sauvagii*. This protein was isolated and characterized by two step HPLC and *de novo* sequencing. The molecular mass of the major component was established by LC-MS / MS as 5898 Da. In addition, this inhibitor proved to be quite stable at various pHs and temperatures despite losing activity even at low concentrations of DTT; However, did not present hemagglutinating or antitumor activity at the tested concentrations. This new inhibitor isolated from the cutaneous secretion of an amphibian increases the knowledge about this rich source of compounds with broad biotechnological potential.

Keywords: *Pithecopus azureus*, Kazal type inhibitor, chemical characterization, trypsin inhibitor.

Lista de figuras

Figura 1 - apresentação de um modelo teórico de inibição reversível competitiva. Extraído de NELSON & COX, 2002.

Figura 2 - Representação duplo-recíproco de uma inibição reversível competitiva. Extraído de NELSON & COX, 2002.

Figura 3 - apresentação de um modelo teórico de inibição reversível acompetitiva. Extraído de NELSON & COX, 2002.

Figura 4 - Representação duplo-recíproco de uma inibição reversível acompetitiva. Extraído de NELSON & COX, 2002.

Figura 5 - apresentação de um modelo teórico de inibição reversível mista. Extraído de NELSON & COX, 2002.

Figura 6 - Representação duplo-recíproco de uma inibição reversível mista. Extraído de NELSON & COX, 2002.

Figura 7 - Representação gráfica da interação da enzima acetilcolinesterase com o inibidor irreversível DIPF - diisopropilfosforofluoridato. Extraído de Berg et al., 2007.

Figura 8 - Exemplar de *Pithecopus azureus*. ©2010 Pedro L. V. Peloso.

Figura 9 - A: Perfil cromatográfico em RP-HPLC da secreção bruta de *Pithecopus azureus*.

Figura 10 - atividade inibitória de tripsina sobre caseína.

Figura 11 – Atividade inibitória de quimotripsina sobre caseína.

Figura 12 - atividade inibitória de tripsina sobre BApNA.

Figura 13 - Atividade inibitória de quimotripsina sobre GApNA.

Figura 14: Avaliação do crescimento de *S aureus*

Figura 15: Avaliação do crescimento de *E coli*

Figura 16 - Perfil do segundo passo cromatográfico em RP-HPLC da fração 1

Figura 17 – Avaliação da atividade inibitória de tripsina a partir das frações do segundo passo cromatográfico da fração 1.

Figura 18 - Avaliação da atividade inibitória de tripsina pela subfração 1.1 em diferentes concentrações.

Figura 19: Efeito do tratamento em diferentes pHs

Figura 20 - Efeito do tratamento em diferentes temperaturas

Figura 21 - Estabilidade subfração 1.1 sob efeito do DTT.

Figura 22 - Representação duplo-recíproco de Lineweaver-Burk

Figura 23 – Determinação da constante de inibição (K_i).

Figura 24: Representação de Michaelis Menten

Figura 25 - Espectro de massa fração 1.1 por LC/MS Orbitrap.

Figura 26 – Espectro de massa de um fragmento da subfração 1.1.

Figura 27 – Sequenciamento de novo pelo Peaks 8.0.

Figura 28 - Alinhamento por Clustal Omega da subfração 1.1 (INPA) com PSPK-I (*P. savagii*).

Figura 29 - Predição da estrutura secundária da subfração 1.1 pelo software online SWISS-MODEL.

Figura 30 – Arvore filogenética entre inibidores tipo Kazal de anfíbios.

Figura 31 - Efeito da subfração 1.1 na viabilidade celular de MCF7.

Figura 32 - Efeito da subfração 1.1 na viabilidade celular de MCF10A.

Figura 33 – Avaliação da atividade hemaglutinante da subfração 1.1.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Inibidores de protease identificados em anfíbios.

Tabela 2 – Sistema de avaliação da inibição enzimática sobre caseína.

Tabela 3 – Sistema de a avaliação da inibição de tripsina sobre BApNA.

Tabela 4 – Sistema de a avaliação da inibição de quimotripsina sobre GApNA.

Lista de abreviaturas e siglas

°C: Graus Celsius.

ACN: Acetonitrila.

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência adquirida (inglês: Acquired Immunodeficiency Syndrome).

Asp 102: Aspartato na posição 102.

ATCC: Coleção Americana de padrões de cultivo (inglês: American Type Culture Collection)

BAPNA: N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride.

C18: octadecilsilano.

CaCl₂: Cloreto de Cálcio.

CID: collision-induced dissociation.

Ctrl: controle

DIPF: Diisopropyl fluorophosphate

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DTT: Ditiotreitól.

FA: Ácido fórmico (inglês: Formic acid).

FDR: Taxa de falsa descoberta (inglês: False Discovery Rate)

GPNA: N-Glutaryl-L-phenylalanine p-nitroanilide.

His 57: Histidina na posição 57.

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana (inglês: Human Immunodeficiency Virus).

IAA: Iodoacetamida.

IECAS: Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina.

INPA: Inibidor de Protease de Phyllomedusa azurea*.

IP: Inibidor de Protease.

KDa: Quilodaltons/Kilodaltons.

Ki: Constante de inibição.

Km: Definição da concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima.

M: Molar

MALDI-TOF: Ionização e Desorção Associada a Matriz/Tempo de voo (inglês: Matrix Associated Laser Desorption-Ionization/Time of Flight).

mg: Miligramas.

min. :Minutos.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

MS: Espectrometria de massa (inglês: Mass Spectrometry).

mV: Milivolts.

NaCl: Cloreto de Sódio.

nm: Nanômetros.

RP-HPLC: Cromatografia de Alta Eficiência por Fase Reversa (inglês: Reversed phase - High-performance liquid chromatography).

RPM - Rotações por minuto.

SA: Ácido Sinapínico (inglês: Sinapinic Acid).

SDS-PAGE: Sulfato de Dodecil Sulfato de Sódio - Electroforese em Gel de Poli Acrilamida (inglês: Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Ser 195: Serina na posição 195.

TCA: Ácido Tricloroacético (inglês: Trichloroacetic acid).

TFA: Ácido Trifluoroacético (inglês: Trifluoroacetic acid).

µg: Micrograma.

µl: Microlitro.

µM: Micromolar.

UV: Ultra violeta.

Vmax: Velocidade máxima.

λ: Comprimento de onda (lambda).

Sumario

1	Introdução	14
1.1	Pithecopus azureus	14
1.2	Protease e inibidores	14
1.2.1	Inibidores de protease	15
1.2.2	Mecanismo de inibição	16
1.3	Inibidores de protease em anfíbios	20
2	Objetivos	24
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	Materiais e métodos	25
3.1	Coleta e extração	25
3.2	Purificação dos inibidores por HPLC	25
3.3	Recromatografia	25
3.4	Ensaio de inibição sobre caseína	26
3.5	Ensaio de inibição sobre substratos sintéticos	26
3.5.1	Tripsina	26
3.5.2	Quimotripsina	27
3.6	Atividade antimicrobiana	28
3.7	Estabilidade em pH e temperatura	28
3.8	Estabilidade com DTT	29
3.9	Determinação do tipo de inibição	29
3.10	Determinação da constante de inibição	29
3.11	Ensaio de viabilidade celular por MTT	29
3.12	Avaliação da atividade hemaglutinante	30
3.13	Espectrometria de massa	30
3.13.1	Sequenciamento de novo	30
3.13.1.1	Digestão das proteínas	30
3.13.1.2	LC/MS – Aquisição de dados	31
3.13.1.3	Análise de dados	31
3.13.1.3.1	Análise pelo software Peaks	32
4	Resultados	33
4.1	Purificação das frações de interesse	33
4.2	Ensaio de inibição sobre caseína	33
4.3	Ensaio de inibição sobre substratos sintéticos	34
4.4	Atividade antimicrobiana	36
4.5	Recromatografia	36
4.6	Estabilidade em pH	38
4.7	Estabilidade térmica	38
4.8	Estabilidade com DTT	39
4.9	Determinação do tipo de inibição	40
4.10	Constante de inibição	41
4.11	Cinética de inibição	41
4.12	Espectrometria de massa	42
4.13	Sequenciamento de novo	43
4.14	Ensaio de viabilidade celular por MTT	45
4.15	Atividade hemaglutinante	46
5	Discussão	47
6	Conclusões	52
7	Perspectivas	53
8	Referências bibliográficas	54

1- Introdução:

1.1 - *Pithecopus (Phyllomedusa) azureus*

A classe Amphibia contém cerca de 7579 espécies descritas divididas entre as ordens Ápoda, Caudata e Anura (Frost, 2016). A espécie *Pithecopus azureus* pertence à família Phyllomedusidae, e está distribuído do leste da Bolívia, Paraguai até o norte da Argentina e em regiões do Pantanal e Cerrado no Brasil Central. É uma espécie de porte médio para o grupo e, deposita seus ovos nas margens de cursos d'água, na vegetação. O hábito de *P. azureus* é caracterizado como arborícola, e, são normalmente observados caminhando sobre galhos e folhas, mesmo tendo a capacidade para o salto. (Freitas, E.B. et al. 2003)

A pele dos anfíbios é uma de suas maiores adaptações, e possui importantes funções para a sobrevivência da espécie, tais como: proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmo e termorregulação; além da secreção de substâncias com atividade biológica que podem proteger contra predadores e microrganismos patógenos. A secreção cutânea dos anfíbios é uma rica fonte natural de peptídeos com atividades anticarcinogênica e antimicrobiana. (Barra & Simmaco, 1995; Nascimento et al., 2003).

Dois tipos principais de glândulas são observados nos anfíbios: as glândulas mucosas e as granulosas (serosa ou venenosa), sendo estas últimas envolvidas na proteção contra predadores e patógenos. As glândulas mucosas também podem influenciar na proteção contra predadores, com a produção de compostos tóxicos ou repelentes, e são responsáveis pela manutenção da umidade, lubrificação da pele, auxiliar na respiração, reprodução, adesão ao substrato e termorregulação. Já a glândula granulosa contém um grande número de compostos biologicamente ativos como aminas, esteroides, alcaloides, peptídeos e proteínas. Estas substâncias apresentam diversas atividades biológicas como neurotóxica, vasoconstritora, alucinógena, anestésica, hipotensiva, antimicrobiana, cardiotoxica, hemotóxica, miotóxica e citotóxica. (Toledo & Jared, 1995; Nascimento et al., 2003).

Além dos peptídeos antimicrobianos, existe outra classe de peptídeos importantes como os inibidores de proteases, que atuam ligando-se às proteases impedindo a sua função, e inativando-as. Os inibidores de proteases têm sido investigados quanto a sua atividade antibacteriana, antifúngica e anticancerígena, sendo moléculas de significativo interesse para futuras aplicações farmacêuticas (Paula et al., 2012).

1.2 - Protease e inibidores:

Proteases são enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, algumas rompem somente a ligação peptídica adjacente aos resíduos de aminoácidos específicos e são classificadas de acordo com seus sítios catalíticos em quatro grandes classes: as serinoproteases, cisteinoproteases, proteases de ácido aspártico e metaloproteases (Grzonka, et al. 2001). As serinoproteases constituem uma classe de enzimas proteolíticas caracterizadas pela presença de uma cadeia lateral de serina reativa, são endopeptidases

que possuem a tríade catalítica formada por Ser195, His57 e Asp102 (Lopes 2006), dentre elas existem três tipos principais de atividade que variam de acordo com o tipo de resíduo localizado na posição P1.

Estas proteases desempenham diversas funções fisiológicas, podendo ser inespecíficas como na degradação de proteínas na digestão, ou mais específicas como nos casos de coagulação sanguínea, apoptose, reprodução e reposta imune (Hedstrom 2002). Mais recentemente estudos realizados *in vitro*, mostraram que inibidores de protease (IP's) induzem efeitos citotóxicos e citostáticos em células tumorais de ovário, mama e próstata sem causar toxicidade em células normais (Dittmann et al., 2003, Saito et al., 2007, Clemente et al., 2009 Joanitti et al., 2010). Apesar do mecanismo de ação desses inibidores como agentes antitumorais ainda não estar completamente elucidado, alguns alvos específicos já foram descritos, como: inibição de enzimas semelhantes à tripsina e quimiotripsina, inibição da atividade proteolítica do proteassomo, indução de apoptose, aumento de expressão de conexina 43 funcional, permeabilização da membrana de lisossomos e bloqueio do ciclo celular (Wan, et al., 1998; Wan et al., 1999; Chen et al., 2005; Losso, 2008; Saito et al., 2007; Souza, et. al, 2014; Tang et al., 2009; Joanitti et al., 2010).

Importantes, também, no campo comercial, além do fisiológico, as proteases representam 60 % do total de enzimas produzidas pela indústria mundial, nas áreas de alimentação e de detergentes (Godfrey; West, 1996).

1.2.1 - Inibidores de proteases:

Qualquer composto que diminua a taxa de degradação de um determinado substrato é, um inibidor enzimático e isso incluem mesmo proteínas que se complexam com proteases. São moléculas cuja massa molecular varia de 10 a 90 kDa, na maioria dos casos (Neurath, 1990).

A melhor forma de compreender o mecanismo de ação das proteases é decifrar a contribuição de seus inibidores naturais e sintéticos para sua regulação. Dessa forma os inibidores de protease têm diferentes mecanismos de ação e são reunidos em famílias de acordo com cada mecanismo, bem como a origem e/ou similaridades estruturais (Perona, 1995). Já em relação a especificidades existem três tipos de inibidores, os que reagem com mais de uma classe de proteases, os que têm preferência por uma classe, e aqueles que são altamente específicos para uma classe de proteases (Craik, 1995).

De acordo com o modo de ação, os inibidores podem ser sítio-específicos, que modificam irreversivelmente um aminoácido do sítio de ação, e aqueles que ocorrem naturalmente, os quais podem atuar como falsos substratos. Tanto os inibidores sintéticos quanto os naturais podem imitar o substrato, competindo com a ligação no sítio ativo das proteases (Travis; Salvesen, 1983).

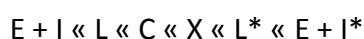
Inibidores sítio-específicos, são, por exemplo, os inibidores de serino proteases, como o diisopropil fosfofluoridato e o fenilmetanosulfonil fluoreto, que reagem com o resíduo de

serina do sítio ativo, e clorometilcetona derivada de aminoácidos e peptídeos que reagem com a histidina da tríade catalítica. As aspártico proteases são inativadas por compostos diazoacetil, assim como por pepstatina. As metaloproteases são, geralmente, inibidas por agentes quelantes metálicos. As carboxipeptidases A e B são especificamente inibidas por um inibidor proteico específico isolado de batata e a termolisina é inibida por fosforamida (Bishop et al., 1981).

Vários inibidores de proteases de origem natural foram isolados do pâncreas, ovos de aves e de certas leguminosas e têm servido como modelos para elucidar os mecanismos de inibição de protease (Bode; Huber, 1992).

1.2.2 - Mecanismo de inibição:

O mecanismo geral da interação enzima-inibidor pode ser escrito como:



Em que: E é a enzima; I e I* são inibidores original e modificado, respectivamente; L e L* são perdos, complexos não covalentes (rapidamente dissociáveis) de E com I e I*; X é a fase intermediária de E + I* e C é o complexo estável enzima-inibidor.

Todos os casos de inibição de proteases estudados têm mostrado que o sítio reativo do inibidor reage com o sítio ativo da enzima, de maneira semelhante. O contato ocorre sobre uma pequena porção da enzima e do inibidor, com um ajuste excelente, por meio da formação de numerosas interações van der Waals, de ligações de hidrogênio e ligações salinas, o que leva a uma pequena alteração conformacional (Laskowsky; Kato, 1980). A constante de equilíbrio para a associação é geralmente alta (de 107 a 1013 M⁻¹). Inibidores irreversíveis (como o inibidor a1-proteinase) formam ligações covalentes com a enzima, que, geralmente, permanecem quando a enzima é desnaturada. Os inibidores que apresentam reversibilidade (aprotinina, ovomucoides, leupeptina) caracterizam-se pelo equilíbrio entre o complexo enzima-inibidor formado e as enzimas livres (Travis; Salvesen, 1983).

1.3 - Tipos de inibição:

O estudo de inibidores enzimáticos tem apresentado informações valiosas a respeito do mecanismo de ação de enzimas e vias metabólicas. Existem duas principais classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis (Nelson & Cox, 2002).

Inibidores reversíveis: Inibição reversível pode ser competitiva, incompetitiva ou mista.

Um tipo de inibição reversível é a competitiva. Um inibidor compete com o substrato pelo sitio ativo da enzima. Quando o inibidor (I) ocupa o sitio ativo ele impede a ligação do substrato (S) com a enzima (E) como ilustrada na figura 1. Inibidores competitivos frequentemente são compostos que se assemelham ao substrato e combinam com a enzima

formando um complexo EI, que impede a catalise. Mesmo ligações rápidas deste tipo irão afetar negativamente a eficiência da enzima.

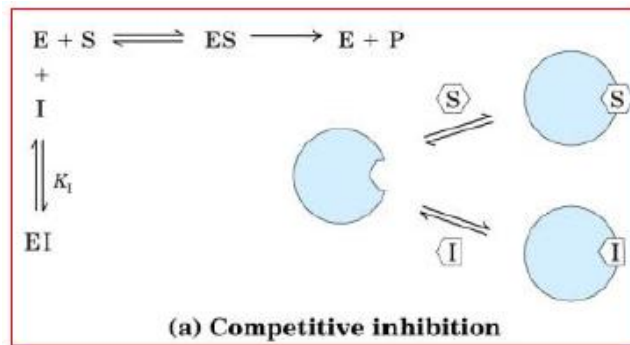


Figura 1 - apresentação de um modelo teórico de inibição reversível competitiva. Extraído de Nelson & Cox, 2002.

Já que o inibidor se liga reversivelmente à enzima, a competição pode ser deslocada para favorecer o substrato simplesmente adicionando-se mais substrato. Quando a concentração de substrato [S] é muito superior à concentração de inibidor [I], a probabilidade que uma molécula de inibidor se ligue à enzima é minimizada, e a reação exibe uma velocidade máxima (V_{max}) normal. Entretanto, a [S] em que $V_0 = \frac{1}{2} V_{max}$, ou K_m aparente, irá aumentar na presença de inibidor como mostrado na figura 2. Este efeito sobre o K_m aparente combinado com a ausência de um efeito na V_{max} é indicativo de inibição competitiva e é facilmente revelada em um gráfico duplo recíproco. A constante de equilíbrio para a ligação de inibidor K_i pode ser obtido a partir do mesmo gráfico, onde: $V_0 = \frac{1}{2} V_{max}$ e $\alpha = (1 + \frac{[I]}{K_i})$.

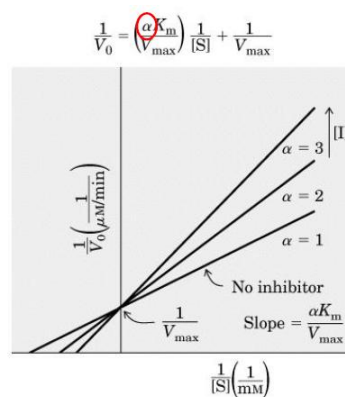


Figura 2 - Representação duplo-recíproco de uma inibição reversível competitiva. Extraído de Nelson & Cox, 2002.

Os outros dois tipos de inibição reversível, incompetitiva e mista, são definidas em termos de um substrato por enzima, mas na prática só são observados com enzimas que possuem dois ou mais substratos. Uma inibição incompetitiva se liga em um sítio distinto do substrato e, diferente da inibição competitiva que se liga a enzima, neste caso o inibidor se liga ao complexo enzima-substrato (ES) como mostrado na figura 3.

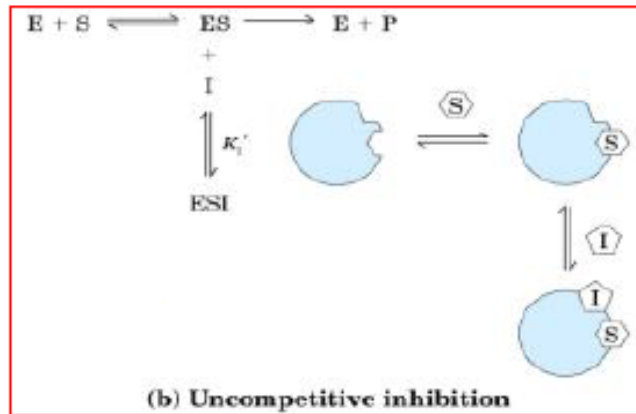


Figura 3 - apresentação de um modelo teórico de inibição reversível acompetitiva. Extraído de Nelson & Cox, 2002.

Já que o inibidor se liga ao complexo ES, o aumento da [S] não reverte a inibição, essa ligação apenas remove uma fração de ES diminuindo o V_{max} e K_m aparente, como mostrado na figura 4, onde: $V_0 = \frac{V_{max}}{1 + \alpha'}$ e $\alpha' = (1 + \frac{[I]}{K_i'})$

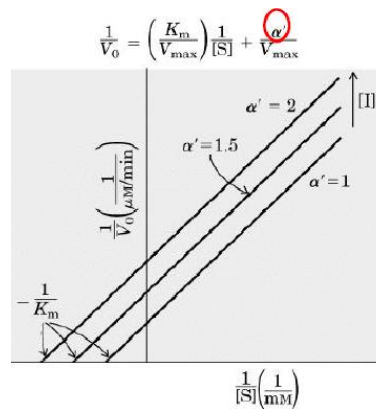


Figura 4 - Representação duplo-recíproco de uma inibição reversível acompetitiva. Extraído Nelson & Cox, 2002.

Uma inibição mista também se liga em um sítio diferente do sítio de ligação do substrato, pode se ligar e bloquear tanto E quanto ES, e, portanto altera tanto V_{max} como K_m . Mostrado na figura 5 e 6 respectivamente, onde: $V_0 = \frac{V_{max}}{1 + \alpha + \frac{\alpha'}{1 + \frac{[S]}{K_m}}}$, $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$ e $\alpha' = (1 + \frac{[I]}{K_i'})$

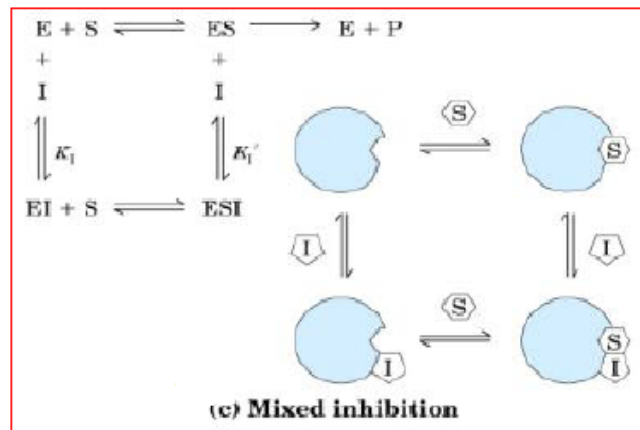


Figura 5 - apresentação de um modelo teórico de inibição reversível mista. Extraído de Nelson & Cox, 2002.

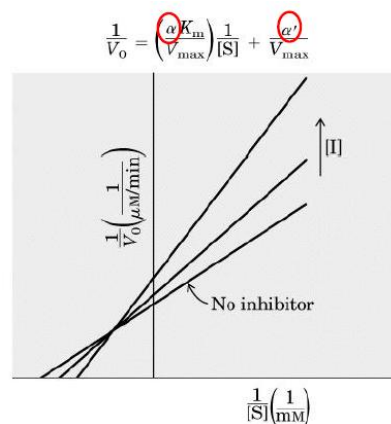


Figura 6 - Representação duplo-recíproco de uma inibição reversível mista. Extraído de Nelson & Cox, 2002.

Inibição irreversível

Inibidores irreversíveis são aqueles que se combinam ou destroem um grupo funcional que seja essencial para atividade da enzima, ou ainda que forme particularmente uma associação não covalente estável (Nelson & Cox, 2002).

Um exemplo clássico de inibição irreversível é o DIPF (diisopropilfosforofluoridato), que reage com a serina. O DIPF é inibidor irreversível da acetilcolinesterase, cuja função é essencial para o funcionamento normal do sistema nervoso (Sadava et al., 2009). Um esquema de interação do DIPF com a acetilcolinesterase é apresentado na figura 7 abaixo.

A cinética de inibição destes inibidores é similar aos inibidores não-competitivos, pois a V_{max} diminui e K_m não se altera e o inibidor atua diminuindo a concentração efetiva de enzima livre (Nelson & Cox, 2002).

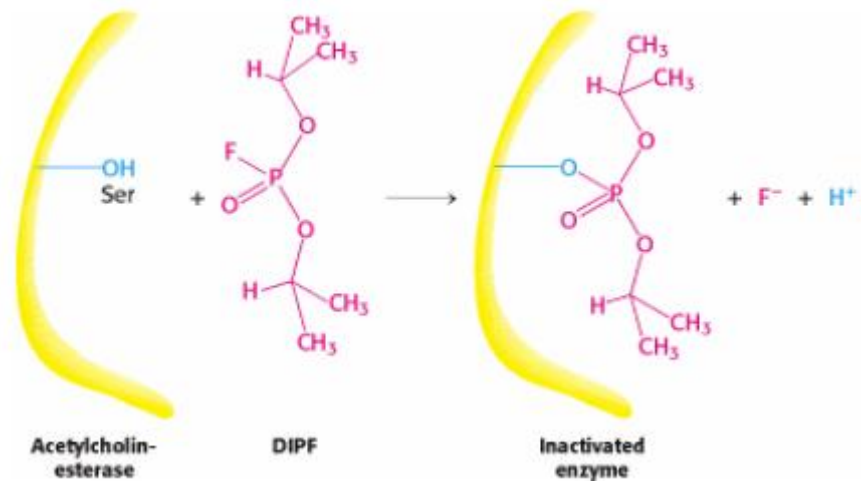


Figura 7 - Representação gráfica da interação da enzima acetilcolinesterase com o inibidor irreversível DIMP - diisopropilfosforofluoridato. Extraído de Berg et al., 2007.

1.3 Inibidores de proteases em anfíbios:

Alguns inibidores de proteases já foram isolados a partir da secreção cutânea ou análise de cDNA de algumas espécies de anfíbios, como mostrado na tabela 1 abaixo:

Tabela 1 - Inibidores de protease identificados em anfíbios:

Familia	Espécie	Nome	Massa (Da)	Sequencias Parciais	Referencia
Bombinatoridade	<i>Bombina bombina</i>	BSTI	9288	MKFTTVILIMAIIVLPCFLYKEMEANFVCPGQTFQTCASSPKTCETRNLVLDKKNQRO GCISSGTVLKS KDSSECVHPSKC	Mignona et al., 1996.
	<i>Bombina maxima</i>		9080	MELTPVIPIMAIIVLPCFLYKEMEANVVCPPGQSFQTCASSCPKTCETRKKVVLCDKKNL GCYCVPGTVLKS KGSSECVNPSKC	Lai et al., 2002.
	<i>Bombina orientalis</i>	BOTI	6446.5	MKLATVILIMAIIVLPCFLYKEMEANFVCPGQSFQTCASSCPKTCETRNL	Chen et al., 2003.
	<i>Bombina variegata</i>	BVTI	6418	MKLTTVILIMAIIVLPCFLYKEIEANFVCPGQSFQTCASSCPKTCETRNL	Chen et al., 2003.
	<i>Bombina microdeladigitata</i>	BMSI I e BMSI II	6365.2 e 9261	MKFTTVILIM AIALPCFLYK EMEANVVCPP GQSFQTCASS CPRPCETRKK GVLDDKKNR GCYCVPGTVL KSKGSSECVN PSKC MKFTTVILIM AIVLPCFLYK EMEANVVCPP GQSFQHCLPA CQRPCETRKK GVLCDKKNR GCYCVPGTVL KSKGSSECVN PSKC	Lu et al., 2008.
	Ranidae	<i>Rana areolata</i>		7812	LMCRMHQYTYSACKGHCPPTCQFRKGPPLCSKKKCVGACICKAPYIARSKTDNRCVLPEDC
	<i>Huia versabilis</i>	HV-BBI	2013.9	SVIGCWTKSIPPRPCFVK	Song et al., 2008.
	<i>Odorrana grahami</i>	OGTI	1948.8	AVNIPFKVHFRCKAAFC	Li et al., 2008.
	<i>Odorrana livida</i>	Ranacyc lin B - RL1	2165	AALRGCWTKSIPPKPCPGKR	Lai et al., 2011.
	<i>Hylarana nigrovittata</i>	Ranacyc lin B - RN1 e RN2	2095.6 1966.0	SALVGCWTKSYPPKPCFGR SALVGCWTKSYPPKPCFGR	Lai et al., 2011.
	<i>Amolops loloensis</i>	Ranacyc lin B - AL1	1940.3	AAFRGCWTKNYSPKPCL	Lai et al., 2011.
	<i>Limnonectes kuhlii</i>	Ranacyc lin B-LK 1 e LK2	2176 2119	SALVGCWTKSWPPKPCFGRG SALVGCWTKSWPPKPCFGR	Lai et al., 2011.
	<i>Odorrana hejiangensis</i>	HJTI	1804.83	GAPKGCWTKSYPPQPCS	Shaw et al., 2012.

Hylidae	<i>Hyla simplex</i>	Hylaser pin I	46709 6100	MKLFTFLCLS...	Wu et al., 2011.
		Hylaser pin II		EESCPPGAVWSTCSNCHAYCKNKDLMCITACQEGCKCTTQGYKIHNNECIPAЕКCP	
	<i>Hyla annectans</i>	Anntoxi n	6724	AQDYRCQLSRNYGKGSFTNYYYDKATSSCKTFRYRGSNGNRFKLTLEDCEATCVTA E	You et al., 2009.
Phyllomedusidae	<i>Agalychnis callydras</i>	ACKTI	5893	ATKPRCQYIVLCPRILRPVCGTDGITYPNECLLQSNRDDEKDVKIQSQGRС	Li et al., 2012.
	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	PSKP I	6702	VIEPKCYKYEGKKCPPDINPVCGETDKRTYYNECALOVFIRQSTKKADKAIKIKKWGKC VIEPDCKKYEGKKPPDIALVCGTNGREYYNECALCVFIRDSTLKADKIKIKKWGKC	Gebhard et al., 2004.
	<i>Phyllomedusa nordestina</i>	PSKP II PI01	6555 11349	MKTLISFALLFSMLATALAPPSQPFELVFTKITEPDCKRYEGKKCPVDMNPVCGTDERTY YNBCALCVFIRTSTKKKDKLIKIGKWEACRKTIPYIK	Neiva et al., 2013.
		PI02	11124	MKTLISSVLIFCILATALAAPPSQAFELVFKQITEPNCKKYEGKKCPVDMNPVCGTDERT YYNECALCCVFRRTSTKKEDKLIKIGKCRETINVK	
Microhylidae	<i>Dyscophus guineti</i>		6301	SPAEVCFLPKESGLCRARALRYYYDRGDGKCEEFIYGGCGGNGNNYKSLLTCKISCE	Conion et al., 2000.
	<i>Kaloula pulchra haiana</i>	KPHTI	23000	DHEVTS	Zhang et al., 2010.
Bufonidae	<i>Bufo andrewsi</i>	Baserpi n	60000 22000	HTQYPDILIAKPXDK EKDSITD	Zhao et al., 2005. Zhao et al., 2005 -2.
		BATI			
Hiperoliidae	<i>Kassina senegalensis</i>	KSCI	6776.8	ADVPKFDLSPDPGP	Wang et al., 2012.

Os IP's possuem um grande potencial biotecnológico. Alguns exemplos já bem-sucedidos de terapias que fazem uso destes peptídeos incluem inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAS) no tratamento de hipertensão, onde a inibição desta enzima impede a formação de angiotensina II e III (potentes vasopressores diretos ou indiretos) e impede a inativação das bradicininas (potentes vasodilatadores) (Cushman, 1978), inibidores de protease no tratamento de HIV, prevenindo o desenvolvimento da AIDS, impedindo que a protease do vírus processe o precursor p55 e p160, que são responsáveis pela formação do capsídeo viral; além dos precursores da transcriptase reversa e proteínas de integração (Mcquade, 1990). Devido a estas características e a constante descoberta de novos IP's na secreção de anfíbios, a busca e caracterização de novos inibidores nestes animais criam possibilidades para o desenvolvimento de novos fármacos.

2 – Objetivos:

2.1- Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo o isolamento, identificação e caracterização química de inibidores de protease presentes na secreção cutânea de *Pithecopus azureus*.

2.2 - Objetivos específicos

- Fracionar a secreção cutânea do anuro brasileiro *Pithecopus azureus* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em sistema de fase reversa.
- Avaliar a atividade inibitória para tripsina e quimotripsina para as frações obtidas.
- Purificar e caracterizar quimicamente as frações com melhores resultados.
- Avaliar a estabilidade dos inibidores em diferentes faixas de pH e temperatura e ao agente redutor DTT.
- Determinar o tipo e a constante de inibição (K_i).
- Analisar as frações ativas identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF;
- Obtenção da sequência dos peptídeos isolados da secreção de *P. azureus* por meio de sequenciamento *de novo*.
- Avaliar o potencial dos peptídeos isolados contra a viabilidade de células tumorais bem como o potencial hemaglutinante.

3 - Materiais e métodos:

3.1 - Coleta e extração:

Adultos de *P. azureus* foram coletados por procura ativa no município de Monte Alegre (GO), Licença SIS/BIO: 51541-1, onde tiveram sua secreção extraída por meio de eletroestimulação a 50 mV por 6 segundos. A secreção presente na pele foi lavada com água, liofilizada (Speed Vac Thermo Savant SPD121P – Thermo Scientific) e armazenada a -20 °C até o uso. Os animais utilizados foram observados por 30 minutos e então devolvidos ao seu local de origem, a técnica empregada para extração não resultou na morte de indivíduos e não apresentou danos físicos ou mudanças comportamentais visíveis nos animais utilizados neste estudo.



Figura 8 - Exemplar de *Pithecopus azureus*. ©2010 Pedro L. V. Peloso - Retirado de http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0110+3629

3.2 - Purificação dos inibidores de tripsina por RP-HPLC:

Alíquotas de 20mg do veneno foram filtradas em filtro de 10 kDa e diluídas em 1 ml de água deionizada com TFA 0,12%, homogeneizadas e aplicadas (200µl) em HPLC de fase reversa (Shimadzu Co. Kioto, Japan série LC 20A), em coluna analítica C18 (Grace-Vydac 5u 218TP54 300Å, 250 x 4.6 mm). As fases móveis utilizadas foram TFA 0.12% (v/v) em água deionizada (solução A) e TFA 0.12% (v/v) em acetonitrila (solução B). A eluição foi feita em um gradiente linear de 0-60-% de B em 60 minutos e 60-100% de B em 5 minutos. A detecção foi feita a 216 nm e as frações coletadas manualmente em tubos plásticos de 1,5ml.

3.3 – Recromatografia:

Alíquotas das frações pré-purificadas foram diluídas em 1ml de água deionizada com TFA 0,12%, homogeneizadas e aplicadas (200µl) em HPLC de fase reversa (Shimadzu Co. Kioto, Japan série LC 20A), em coluna analítica C18 (Phenomenex Sinergy Hydro 4u 217643-13, 250

x 4.6 mm). As fases móveis utilizadas foram as mesmas descritas acima. A eluição foi feita a um gradiente linear de 0-35% de B em 5 minutos e 35-45% em 20 minutos. A detecção foi feita a 216nm e as frações foram coletadas manualmente em tubos plásticos de 1,5ml.

3.4 - Ensaio de inibição sobre caseína:

A análise de inibição de tripsina sobre caseína foi realizada segundo Kakade et al (1969) com modificações. O ensaio é feito utilizando tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,6), caseína 1%, solução de tripsina (0,064 mg/ml em HCl 0,001M), Quimiotripsina (0,63 mg/ml em HCl 0,001M) e TCA 5% para interromper a reação.

Para o controle positivo a enzima é incubada com a caseína a 37°C por 20 minutos. Após o período de incubação é acrescentado o TCA por 1 hora a temperatura ambiente e em seguida, centrifugado e o sobrenadante lido a 280nm no espectrofotômetro. Para o controle negativo, a enzima é incubada com o TCA antes do substrato para inativação da enzima. Os demais procedimentos são iguais aos descritos acima.

Os volumes de cada reagente foram adaptados para um volume final de 1 ml no sistema de reação apresentado na tabela 2 abaixo.

Tabela 2 – Sistema de avaliação da inibição enzimática sobre caseína.

Ctrl + (com enzima)								
Enzima (ml)	Caseína (ml)	37°C	TCA (ml)	25°C	Centrifugação	Abs (nm)		
0,2	0,2	20 min.	0,6	1h	9000rpm/10min	280		
Ctrl - (sem enzima)								
Enzima (ml)	Tampão (ml)	TCA (ml)	Caseína (ml)	25°C	Centrifugação	Abs (nm)		
0,1	0,1	0,6	0,2	1h	9000rpm/10min	280		
Atividade inibitória								
Enzima (ml)	Amostra (ml)	37°C	Caseína (ml)	37°C	TCA (ml)	25°C	Centrifugação	Abs (nm)
0,1	0,1	15 min.	0,2	20 min.	0,6	1h	9000rpm/10 min.	280

3.5 - Ensaio de inibição com substratos sintéticos:

3.5.1 – Tripsina:

A análise da inibição de tripsina foi realizada segundo o método de Erlanger et. al.(1961) com modificações, apresentado na tabela 3, e obtida por meio de leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) e a leitura foi feita por meio do software SkanIt for multiskan FC 2.5.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). O

substrato utilizado foi o BAPNA - Benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,43 mg/mL.

Inicialmente o substrato é diluído em 500µl de DMSO e o volume final necessário completado com a adição de tampão Tris-HCl (50mM) + CaCl₂ (20mM), pH 8,2. Para os cálculos de concentração da enzima (Tripsina) foi utilizado um espectrofotômetro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O preparo da enzima foi feito dissolvendo-se uma quantidade mínima de enzima em 1 mL de HCl 1mM, que foi diluída consecutivamente em tampão Tris-HCl até atingir a concentração final de 0,064 mg/ml medida espectrofotômetro ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

Calculo para a concentração de enzima: $A_{280} \times 10 = 15,9$

Onde o coeficiente de exclusão molar é $A(280, 1\%) = 15,9$

Tabela 3 – Sistema de a avaliação da inibição de tripsina sobre BApNA.

	Tampão	Amostra	Enzima		Substrato		Ac. Acético
100% hidrolise	40 µl	-	40µl	15 min	200µl	30 min	30µl
0% de hidrolise	80µl	-	-				
Amostra	-	40µl	40µl				

3.5.2 – Quimotripsina:

A análise da inibição de quimiotripsina foi realizada segundo o método de Erlanger et. Al (1961) com modificações, apresentado na tabela 4, e obtida por meio de leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) e a leitura foi feita por meio do software SkanIt for Multiskan FC 2.5.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA). O substrato GPNA - *N*-glutaryl-L-phenylalanine *p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 0,80 mg/mL. Inicialmente o substrato é diluído em 500µl de DMSO e o volume final necessário completado com a adição de tampão Tris-HCl (50mM) + CaCl₂ (20mM), pH 7,6. Para os cálculos de concentração da enzima foi utilizado um espectrofotômetro do modelo Shimadzu 1800 UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O preparo da enzima foi feito dissolvendo-se uma quantidade mínima de enzima em 1 mL de HCl 1mM, que foi diluída consecutivamente em tampão Tris-HCl até atingir a concentração final de 0,63 mg/ml medida espectrofotômetro ($\lambda = 280 \text{ nm}$). Todos os ensaios foram feitos em placa multipoços de fundo chato e leitura a 405 nm.

Calculo para a concentração de enzima: $A_{280} \times 10^{-2} = 20,4$

Onde o coeficiente de exclusão molar é $A(280, 1\%) = 15,9$

Tabela 4 – Sistema de a avaliação da inibição de quimotripsina sobre GApNA.

	Tampão	Amostra	Enzima		Substrato		Ac. Acético
100% hidrolise	40 µl	-	40µl	15 min	200µl	30 min	30µl
0% de hidrolise	80µl	-	-				
Amostra	-	40µl	40 µl				

3.6 – Atividade antimicrobiana:

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita em meio líquido. Para isso os microorganismos testados são cultivados em meio Mueller-Hinton por 24h a 37°C. Após este período, os microorganismos são monitorados quanto a densidade óptica, que deve ser 1 a 595nm.

Ao constatar a fase de crescimento exponencial, os microorganismos são diluídos na proporção 1:50, para Gram-negativos e 1:100 para Gram-positivos. A partir desta solução de bactérias, coloca-se 50µl em cada um dos poços em uma placa de 96 poços. As amostras testadas foram incubadas com as bactérias durante 24h a 37°C em uma proporção 1:1 (v/v).

As bactérias utilizadas Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) e as Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Como controle de crescimento usou-se o meio Mueller-Hinton e como controle de inibição Ofloxacino 400mg. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.7 - Estabilidade de pH e temperatura:

O efeito do pH na atividade inibitória das frações da secreção de *P. azurea* foram avaliadas em uma faixa de pH que vai de 2 a 12 usando os seguintes tampões:

Citrato de sódio 100 mM, pH 2; acetato de sódio 100 mM, pH 4; fosfato de sódio 100 mM, pH6; Tris-HCl pHs 7 e 8; e bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10. As frações foram incubadas com o tampão por 15 min a 37°C e posteriormente incubadas por mais 15 com a tripsina em pH 8.2 e, em seguida, por mais 30 minutos incubada com o substrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O efeito da temperatura na atividade inibitória das frações da secreção de *P. azureus* foi mensurado de 4-100°C. As frações são incubadas por 30 minutos a 10, 20, 40, 80 e 100°C. Após o período de incubação as amostras são colocadas a 25°C e em seguida o ensaio de inibição será realizado como descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8 - Estabilidade com DTT:

O efeito da estabilidade do inibidor ao agente redutor DTT foi mensurada de acordo com o protocolo de Pesati et. al, 2015. Onde 50µg do inibidor são incubadas com DTT em uma concentração final de 1, 10 e 100uM por 15, 30, 60 e 120 minutos a 37°C. A reação é parada adicionando-se o dobro de IAA em relação ao DTT. Após a parada da reação, a atividade antitriptica é medida como descrito no item 3.4.1 acima.

3.9 - Determinação do tipo de inibição:

Para determinar o tipo de inibição foi utilizado o método de Lineweaver-Burk (1934), estabelecendo um gráfico de duplo recíproco, onde o intercepto y é equivalente ao inverso de Vmax; A intersecção x do gráfico representa $-1 / K_m$.

Quando usado para determinar o tipo de inibição enzimática, o gráfico de Lineweaver-Burk pode distinguir inibidores competitivos, não competitivos e incompetivos. Inibidores competitivos têm o mesmo intercepto no eixo y com a enzima não inibida (já que Vmax não é afetado por inibidores competitivos, o inverso de Vmax também não muda), mas há diferentes inclinações e intercepções entre os dois conjuntos de dados. A inibição não competitiva produz parcelas com a mesma intercepção de x que a enzima não inibida (K_m não é afetada), mas diferentes inclinações e intercepções de y. A inibição não competitiva causa diferentes intercepções nos eixos y e x.

3.10 - Determinação da constante de inibição (K_i):

A atividade do inibidor foi acompanhada pela dosagem de atividade residual da tripsina pela hidrolise do BAPNA. Os ensaios são feitos em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo CaCl₂ 20mM; 40ul de tripsina (0,064mg/ml) foram pré-incubadas a 37°C por 15 min com concentrações crescentes de inibidor. Em seguida adiciona-se 200ul de BAPNA (0,43mg/ml) e incuba-se novamente a 37°C por 30 minutos. A reação é interrompida pela adição de 30ul de ácido acético 30% (v/v) e as dosagens são realizadas em placa de 96 poços a 405nm.

Os valores de K_i serão então calculados segundo o método de Dixon (1953), Em que a velocidade recíproca, $1 / v$, é traçada contra a concentração do inibidor, [I], a dois ou mais valores de [S] (concentração do substrato). Para cada valor de [S], os pontos ficam em uma linha reta, e as linhas extrapoladas em diferentes valores de [S] se cruzam em um único ponto, para o qual $1 = -K_1$ e $1 / v = 1 / V$, onde K_i é a constante de dissociação do complexo EI, e V é a velocidade máxima.

3.11 – Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT estabelecido por Mosmann (1983). As linhagens de células de câncer MCF7 e células não cancerígenas MCF10A, mantidas no banco de células em nitrogênio líquido, foram descongeladas e 500µl das alíquotas foram lentamente adicionadas a um frasco de cultura de células com 5ml de meio de cultura completo: para MCF7 foi utilizado Eagle's Minimum Essential Medium - EMEM - com 0.01 mg/ml de insulina humana, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Para MCF10A, foi utilizado o meio MEM com os aditivos do kit: MEGM, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico.

Os ensaios foram realizados em triplicata. Um grupo controle foi feito apenas com células e meio de cultura e o outro com células e hidroxidaunorrubicina; a viabilidade celular será foi determinada pela média da triplicata de cada fração testada.

3.12 – Avaliação da atividade hemaglutinante:

Foram coletados assepticamente e 1ml de sangue murino, homogeneizado com NaCl 0,15M bem como centrifugado por 10 min, a 2.500 rpm. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em salina seguida de nova centrifugação nas mesmas condições (2.500 rpm/10 min), em temperatura ambiente. O procedimento foi realizado 4 vezes, até a completa lavagem dos eritrócitos. Em placas de microtitulação de fundo em U (Sigma) foram adicionados 50 µl de tampão em cada poço. Posteriormente, foram acrescidos 50 µl das amostras proteicas, nos primeiros poços da coluna e diluídas serialmente de 2 µg/µl (concentração inicial) até 0,001µg/µl (concentração final). Após isso, adicionou-se em todos os poços 50 µl de suspensão de eritrócitos a 3 % (v/v) e a placa mantida em repouso por 60 minutos. A última coluna representou o controle, sem material proteico. O mesmo procedimento foi realizado, em triplicata, com as Lectina (1.9mg/ml). Os ensaios foram realizados com eritrócitos intactos.

3.13 - Espectrometria de massa:

As frações cromatográficas que apresentaram atividade inibitória para tripsina foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF modelo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (AB Sciex, Framingham, MA, EUA). As frações foram ressuspendidas em acetonitrila 50% contendo TFA 0,1% e 0,5 µL de cada fração cromatográfica aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com matriz ácido sinapínico (SA 20 µg/µL) ressuspendida em acetonitrila 50% contendo 0,1% de TFA (v/v). O procedimento foi realizado no modo refletido positivo, sendo a faixa m/z analisada a partir de 4000 Da.

3.13.1 - Sequenciamento *de novo*:

3.13.1.1 - Digestão de proteínas:

Para a digestão com tripsina:

Uma alíquota de cem microgramas de proteína foi digerida segundo o método de Haider et.al., (2012). À solução de proteína foi adicionado 15µl de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 50 mM e 1,5µl de 1, 4-Dithio- DL-threitol (DTT) 100mM e incubado a 90°C durante 7 minutos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, adicionou-se 3 µL de iodoacetamida (IAA) 100 mM a esta solução e incubou-se durante 25 min no escuro. Após esse período acrescentou-se 1 µL de 0,1 µg / µL de tripsina modificada para espectrometria de massas e incubou-se a 37 ° C durante 4 h. Finalmente, adicionou-se mais 1 µL de tripsina e incubou-se durante a noite a 30 ° C. No dia seguinte a solução foi dessalinizada usando micro colunas de C18 com água/TFA 0,12% e eluídas com Acetonitrila/TFA 0,12%.

Para a digestão com Quimotripsina e Glu-C:

Uma alíquota de cem microgramas de proteína foi incubada em uma solução de ureia 8M, tiourea 2M em um tampão de TRIS-HCl 50mM pH 7,6. Após dissolver bem a proteína, adicionou-se DTT em uma concentração final de 10mM e incubou-se por uma hora a 30°C. Após este passo, a amostra foi alquilada com Iodoacetamida em uma concentração final de 40mM e incubou-se a amostra no escuro por uma hora. Em seguida dilui-se a amostra 10 vezes com tampão TRIS-HCl 50mM e acrescenta-se 50µl de Glu-C a 0,2µg/µl ou 100 µl de Quimotripsina a 0,2µg/µl e deixa reagindo overnight. No dia seguinte a solução foi dessalinizada usando micro colunas de C18 com água/TFA 0,12% e eluídas com Acetonitrila/TFA 0,12%.

3.13.1.2 - LC-MS / MS aquisição de dados

As amostras de peptídeos foram ressuspensas em ácido fórmico a 0,5% (FA) e fracionadas utilizando um sistema nano HPLC Easy-nLC II (Proxeon) numa embalagem interna 2 cm × 150 µm; Pré-coluna (Reprosil-Pur C18-AQ, 5 µm, 120 Å, Dr. Maisch) e 20 cm × 75 µm i.d. (Reprosil-Pur C18-AQ, 3 µm, 120 Å, Dr. Maisch) acoplado a um espectrômetro de massa LTQ Velos Orbitrap (Thermo Scientific). A cromatografia foi realizada a 300 nL / min com 95% de água, 5% de ACN e 0,1% de FA como fase móvel A e 95%, 5% de água e 0,1% de FA como fase B.

O espectrômetro de massa Orbitrap foi controlado pelo software Tune 2.6.0 e Xcalibur 2.1 e foi configurado para operar no modo de aquisição dependente de dados (DDA) para alternar automaticamente entre MS completo e aquisição de MS / MS. Os 10 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação por CID-MS / MS.

3.13.1.3 - Análise de dados:

Os espectros filtrados presentes em cada amostra foram carregados no software De novoGUI para realizar o sequenciamento *de novo*. Os seguintes parâmetros foram aplicados: carboxamidometilação de cisteínas como modificação fixa, amidação c-terminal como modificação variável e digestão com tripsina ou sem digestão (para as amostras digeridas com Glu-C e Quimotripsina). Usamos então PepExplorer para processar todos os peptídeos

(Picos ALC pontuação superior a 75 e sequências com 6 ou mais resíduos de aminoácidos) e realizar uma busca de similaridade de sequência contra uma base de dados do Uniprot entradas da família Hylidae. Finalmente, o PepExplorer agrupou as identificações de acordo com a abordagem de parcimônia máxima. Apenas os peptídeos possuindo alinhamentos com pelo menos 75% de identidade de sequência contra uma sequência da base de dados foram aceites e as proteínas foram filtradas a 1% de FDR.

3.13.1.3.1 - Análise pelo software Peaks:

Para a análise dos dados, os arquivos com a extensão “.raw” gerados pelo espectrômetro, foram importados pelo software PEAKS 8.0 para a realização de sequenciamento *de novo* dos peptídeos a partir dos espectrogramas e buscas em bancos de dados. Neste, alguns parâmetros de busca foram ajustados, incluindo carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e amidação c-terminal como modificação variável, tolerância de erro de massa dos íons precursores e dos íons fragmentos em 10 ppm e 0,5 Da, respectivamente. Score de sequenciamento local acima de 60% foi utilizado para considerar as identificações como positivas. Um banco de dados contendo sequências peptídicas correspondentes à família Hylidae (5574 sequencias, UniProt, acesso em Outubro de 2016) foi gerado no formato FASTA. Este foi inserido no PEAKS e foi confrontado com as sequências peptídicas experimentais.

4- Resultados:

4.1 - Purificação das frações de interesse:

Alíquotas de 10 mg/ml da secreção bruta de *P. azureus* foram fracionadas em coluna C18 (Grace Vydac 5u 218TP54 300Å, 250 x 4.6mm) por RP-HPLC a um fluxo de 1ml/minuto, e obteve-se um perfil cromatográfico como apresentado na figura 9 abaixo. Cada corrida resultou, em média, em 40 frações cromatográficas coletadas manualmente.

Para todas as frações eluídas a partir do primeiro passo cromatográfico foi feito um ensaio exploratório a procura de inibidores de tripsina e quimotripsina. Resultando assim em pelo menos 6 frações principais com atividade inibitória, como destacado na figura 1.

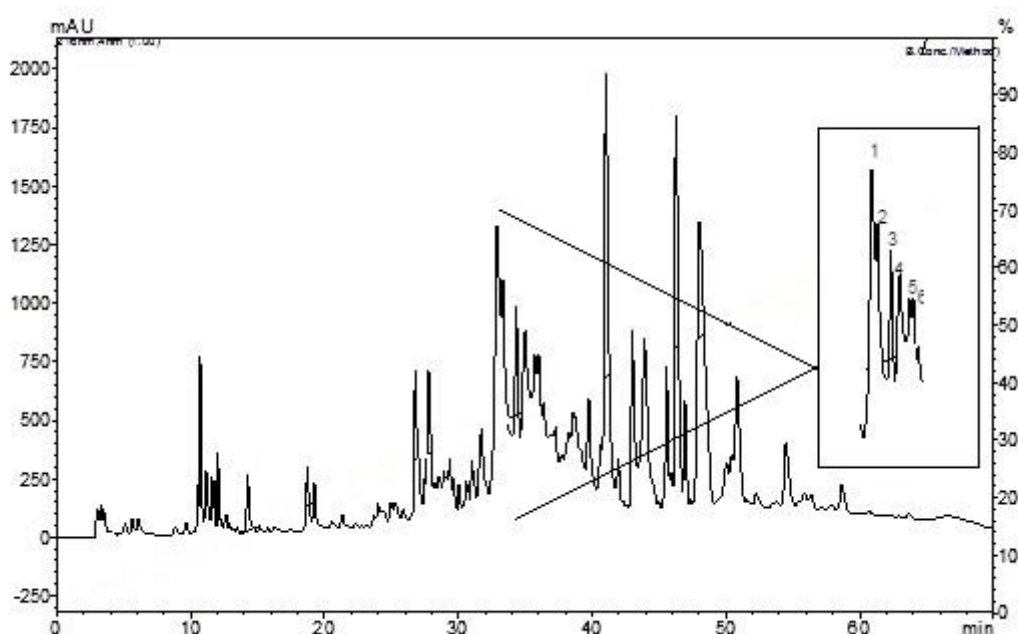


Figura 9 - A: Perfil cromatográfico em RP-HPLC da secreção bruta de *Pithecopus azureus* em coluna C18 (Grace Vydac 5u 218TP54 300Å, 250 x 4.6mm) para um fluxo de 1,0ml/min. O monitoramento foi realizado a 216nm e todas as frações coletadas manualmente. As frações que apresentaram atividade inibitória contra tripsina estão enumeradas de 1 a 6. B: Inserto ampliado das frações de interesse.

4.2 - Ensaio inibidor utilizando caseína como substrato:

A atividade inibitória sobre caseína foi primariamente avaliada com a secreção bruta de *P. azureus* a uma concentração de 1mg/ml bem como com as frações 1 a 6. Para tripsina a maior atividade se deu por volta de 90% (fração 2) e as frações 5 e 6 não apresentaram atividade inibitória na concentração testada, como ilustrado na figura 10 abaixo.

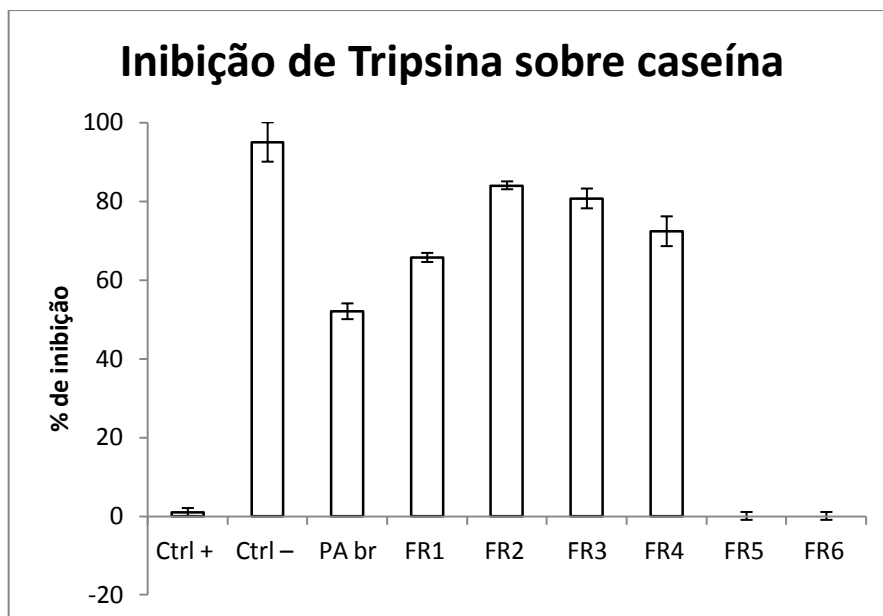


Figura 10 - Atividade inibitória de tripsina (0,064mg/ml) sobre caseína 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,6 a 37°C. O controle positivo contém Tripsina, caseína 1%, e TCA5%. A leitura foi realizada a 405nm.

Já a atividade inibitória sobre quimotripsina, quando avaliada nas mesmas condições que para tripsina, não apresentou praticamente nenhuma atividade das frações e cerca de 10% para a secreção bruta. Os resultados estão apresentados na figura 11 abaixo.

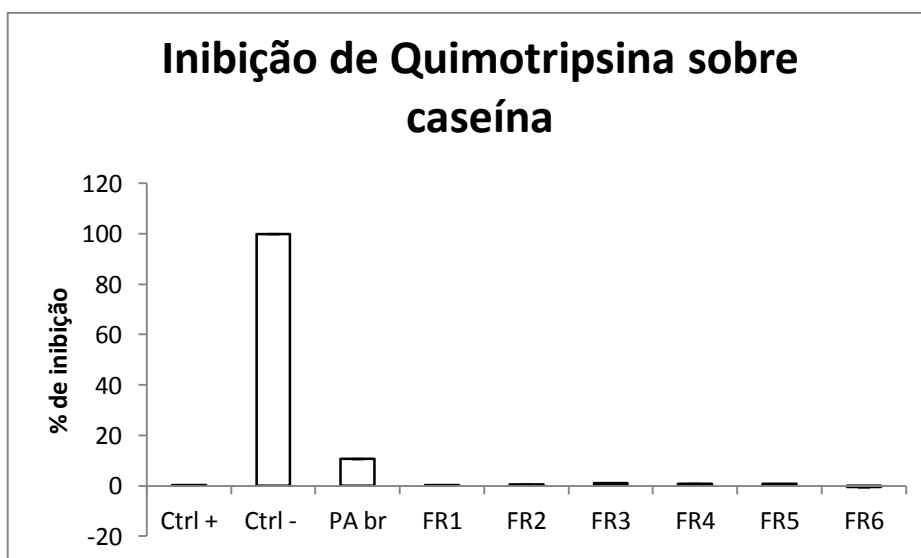


Figura 11 – Atividade inibitória de quimotripsina (0,63mg/ml) sobre caseína 1%. O tampão de ensaio usado foi fosfato de sódio 0,1M pH 7,6 a 37°C. O controle positivo contém Quimotripsina, caseína 1%, e TCA5%. A leitura foi realizada a 405nm.

4.3 - Ensaio de inibição usando substrato sintético:

A atividade inibitória sobre tripsina e quimotripsina foi primariamente avaliada com a secreção bruta de *P. azureus* a uma concentração de 2,5mg/ml bem como com as frações 1

a 6. Para tripsina a maior atividade se deu entre 96 e 100% para todas as frações testadas como ilustrado na figura 12 abaixo. O substrato utilizado foi BApNA.

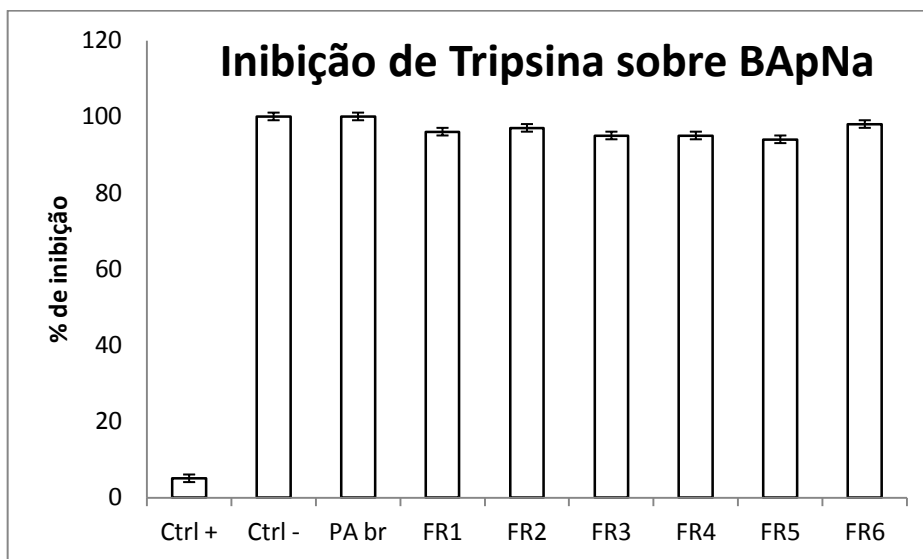


Figura 12 - Atividade inibitória de tripsina sobre BApNA. O tampão de ensaio usado foi Tris-HCl, pH 8,2 a 25°C por 30 minutos. O controle positivo contém enzima e substrato, e o controle negativo contém somente substrato. A leitura foi realizada a 405nm.

Para quimotripsina a secreção bruta não apresentou atividade inibitória significativa, somente 10% de inibição; para as frações, a maior atividade apresentou 32% de inibição para a fração 2 como ilustrado na figura 13 abaixo.

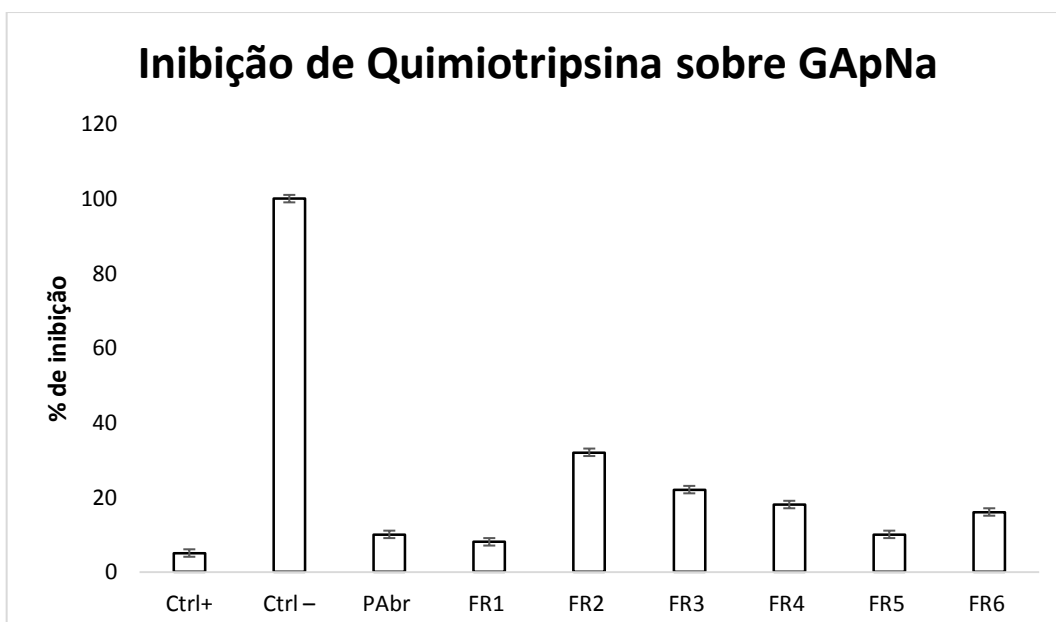


Figura 13 - Atividade inibitória de quimiotripsina sobre GApNA. O tampão de ensaio usado foi Tris-HCl, pH 7,6 a 37°C por 30 minutos. O controle positivo contém enzima e substrato, e o controle negativo contém somente substrato. A leitura foi realizada a 405nm.

4.4 - Atividade antimicrobiana:

A atividade antimicrobiana das frações obtidas no primeiro passo cromatográfico foi mensurada tanto para microrganismo gram-positivo, como para gram-negativo. É possível notar que, nas concentrações testadas, a atividade inibitória de crescimento não foi expressiva, como mostrado nas figuras 14 e 15 abaixo:

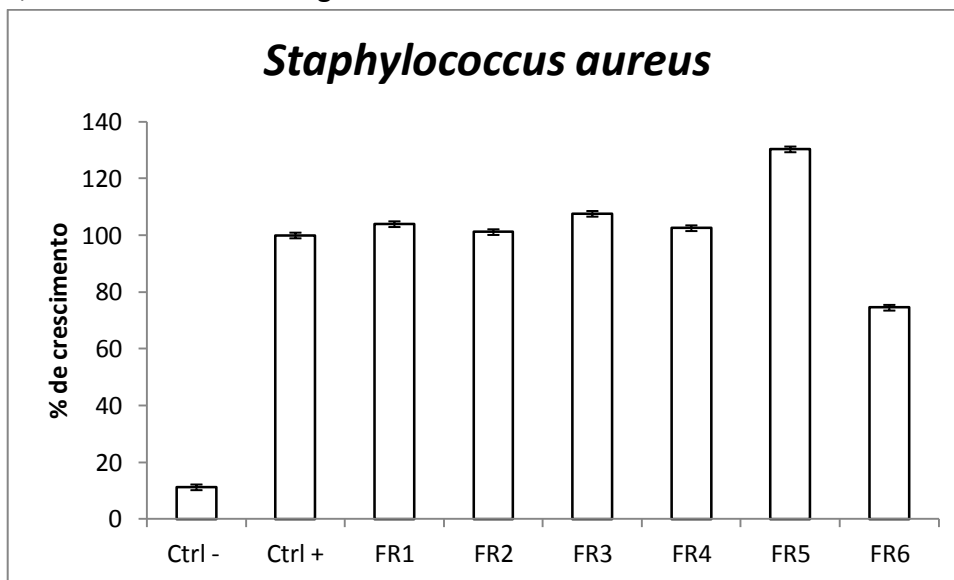


Figura 14: Avaliação do crescimento de *S. aureus* após o tratamento com as frações do primeiro passo cromatográfico da secreção cutânea de *P. azureus*. Como controle de inibição foi usado Ofloxacino 40mg/ml.

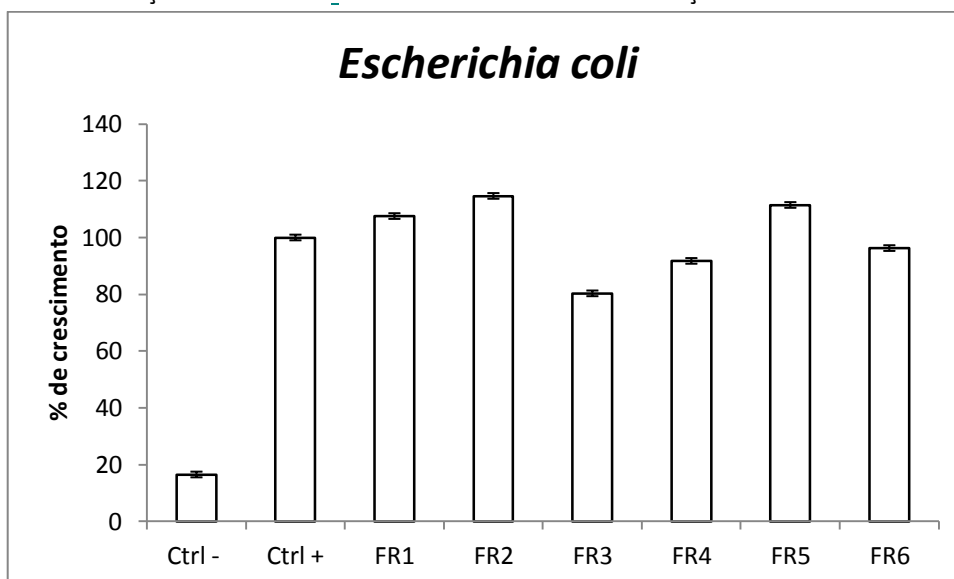


Figura 15: Avaliação do crescimento de *E. coli* após o tratamento com as frações do primeiro passo cromatográfico da secreção cutânea de *P. azureus*. Como controle de inibição foi usado Ofloxacino 40mg/ml.

4.5 – Recromatografia:

O perfil do segundo passo cromatográfico da fração 1 está apresentado na figura 10 abaixo. Cada corrida desta fração resultou, em média, em 3 frações cromatográficas coletadas manualmente. A subfração 1.1 foi escolhida para posterior caracterização e continuidade deste estudo.

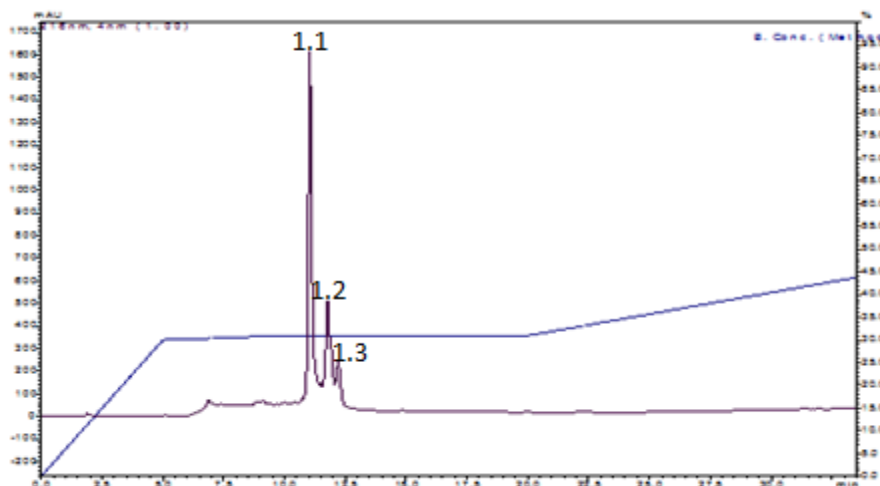


Figura 16 - Perfil do segundo passo cromatográfico em RP-HPLC da fração 1 em coluna Phenomenex Synergi fusion RP 80 A 4u - 150 x 4,6mm, a um fluxo de 0,6ml/min.

Para cada uma das frações eluídas do segundo passo cromatográfico, também foram avaliadas quanto à inibição contra tripsina (figura 17). Além disso, para a subfração 1.1, também foi avaliada a atividade antitriptica em diferentes concentrações (0-80ug), entretanto não se observou um efeito significativamente diferenciado em diferentes doses, como apresentado na figura 18 abaixo.

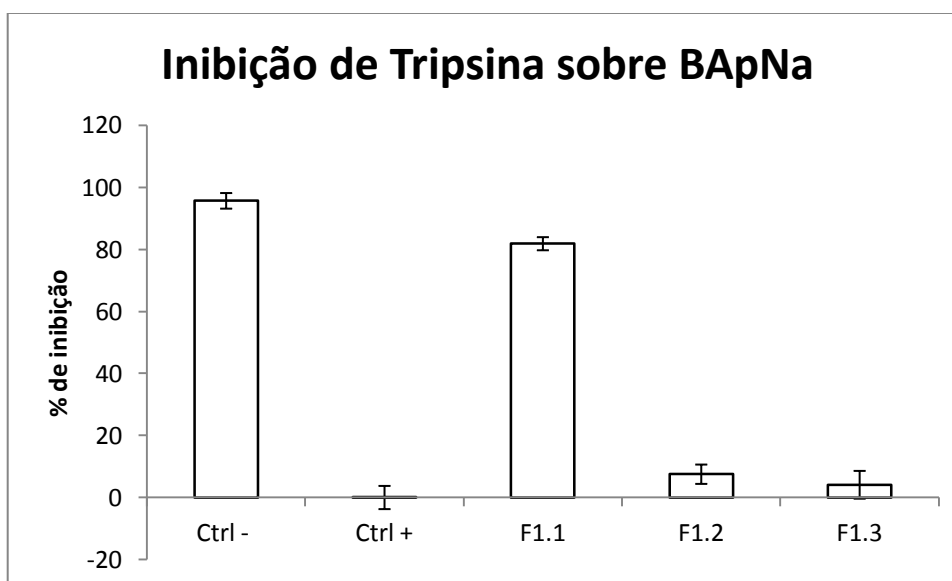


Figura 17 – Avaliação da atividade inibitória de tripsina a partir das frações do segundo passo cromatográfico da fração 1. O tampão de ensaio utilizado foi Tris-HCl pH 8.2 a 37°C.

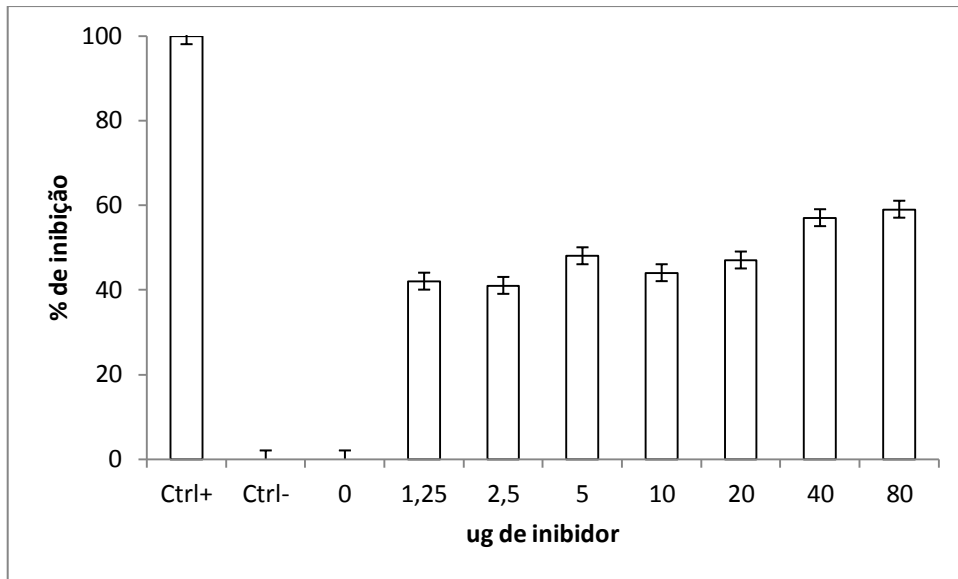


Figura 18 - Avaliação da atividade inibitória de tripsina pela subfração 1.1 em diferentes concentrações. O tampão de ensaio utilizado foi Tris-HCl pH 8.2 a 37°C. Observa-se maior atividade inibitória em 80 µg.

4.6 - Estabilidade em pH:

A avaliação dos efeitos da variação de pH (2-10) revelou uma boa estabilidade do inibidor contra tripsina durante 45 min como mostrado na figura 19 abaixo, onde o controle é 100% da atividade de tripsina e a coluna nomeada como 'inibidor' é a subfração INPA 1.1 sem nenhum tratamento. Todas as amostras estão em uma concentração de 0,2µM.

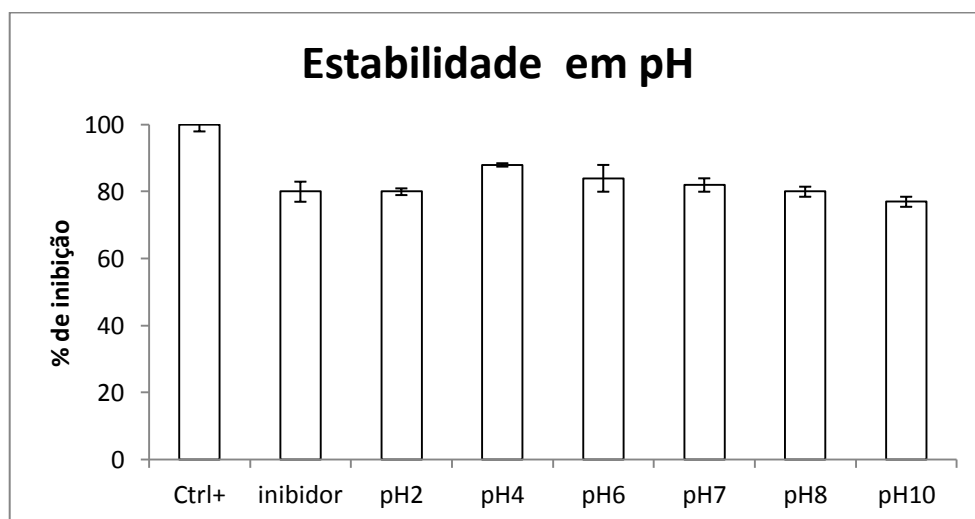


Figura 19: Efeito do tratamento em diferentes pHs na atividade inibitória contra tripsina. O controle é 100% de hidrólise do substrato e o inibidor é a subfração 1.1 em tampão Tris-HCl pH 8.2. Todos os tratamentos contem a subfração 1.1 0,2µM. $p < 0,05$.

4.7 - Estabilidade térmica:

A avaliação do efeito da variação da temperatura sobre a atividade inibitória (10-96°C) se mostrou bastante estável em todas as temperaturas testadas. Primeiramente foi avaliada a

atividade inibitória a 25°C como descrito no protocolo padrão. Em seguida avaliou-se a atividade a 37°C - temperatura onde a tripsina apresenta pico de atividade. Para a realização do ensaio, após cada tratamento, a amostra foi arrefecida até a temperatura ambiente e depois testada como descrito anteriormente.

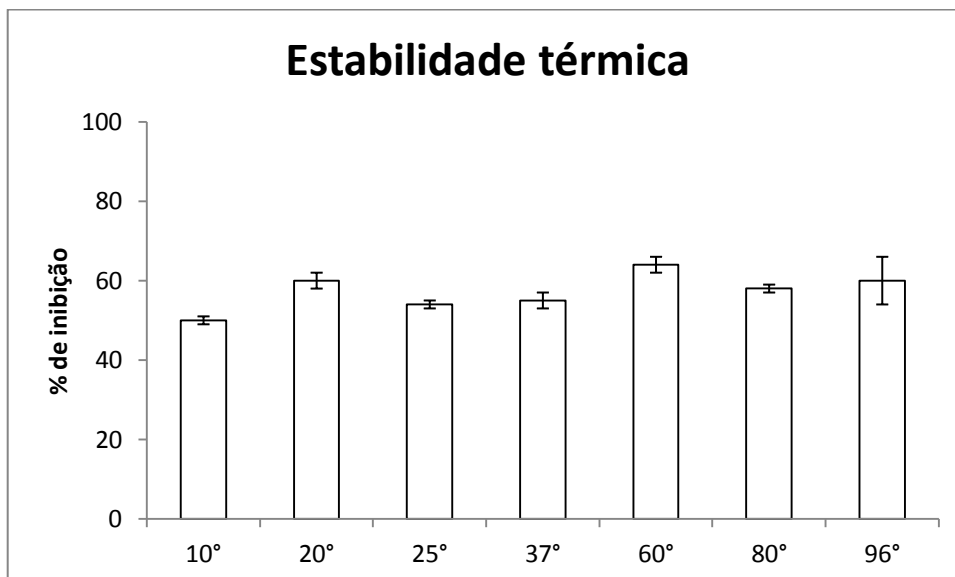


Figura 20 - Efeito do tratamento em diferentes temperaturas na atividade inibitória de tripsina pela subfração 1.1 (0,2µM) sobre o substrato sintético BApNa em tampão Tris-HCl pH 8.2 contra tripsina por 45 minutos. Foi observada diferença estatística somente quando submetido a 96° para $p \leq 0,05$.

4.8 - Estabilidade com DTT:

O DTT nas concentrações de 10 e 100 µM afetou a atividade inibitória em os intervalos de tempo, de modo que a atividade de tripsina se aproximou de 100%. No entanto, na concentração de 1µM a atividade de tripsina diminuiu ao longo do tempo, mas manteve-se acima de 70%.

Esse resultado deixa claro que o inibidor tem baixa estabilidade ao agente redutor e tem a atividade prejudicada mesmo em baixas concentrações, como apresentada na figura 21.

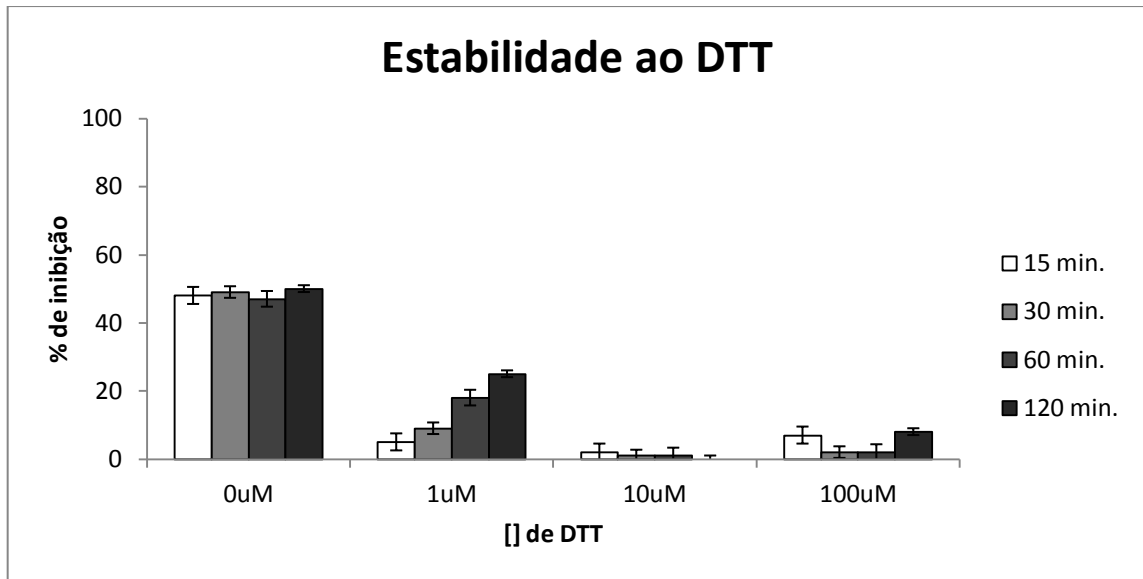


Figura 21 - Estabilidade subfração 1.1 sob efeito do DTT. O inibidor na concentração de 0,2 μ M, foi tratado com diferentes concentrações finais (1-100 μ M) de DTT durante 15-120 min, a 37 ° C. Interrompeu-se a reação com iodoacetamida (concentração de duas vezes em relação ao DTT), e mediu-se a atividade inibidora residual da tripsina. O tampão de ensaio usado foi Tris-HCl pH 8.2.

4.9 - Determinação do tipo de inibição:

A atividade inibitória de tripsina na presença da subfração 1.1 foi medida em diferentes concentrações de substrato. Os dados cinéticos são mostrados na figura 22 abaixo.

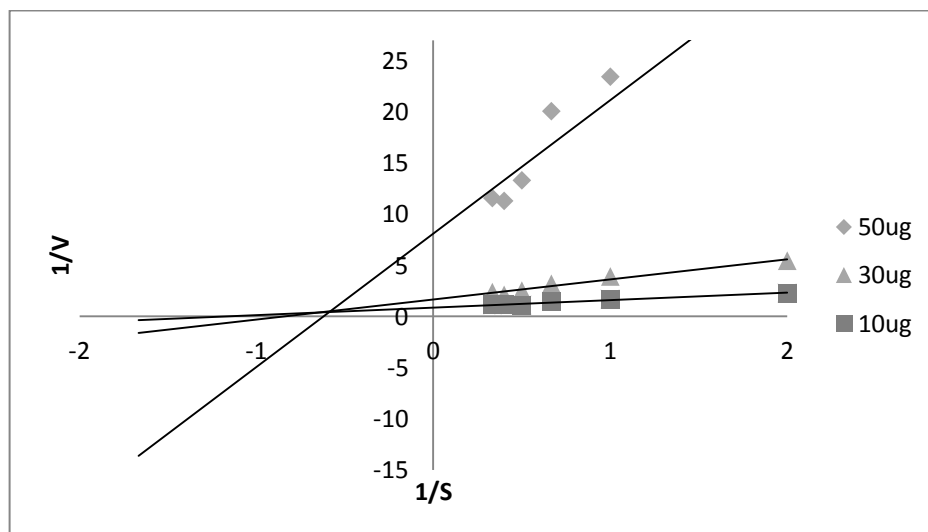


Figura 22 - Representação duplo-recíproco de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina pela subfração 1.1. A inibição da atividade da tripsina pela subfração foi feita incubando 40 μ l de tripsina e solução de BApNA (0,0 a 2,0 mM) com sistema reacional contendo de 10 a 50 μ g de inibidor.

Inibidores não competitivos têm o mesmo intercepto no eixo x (já que V_{max} é afetado por inibidores não competitivos), mas há diferentes inclinações e interceptações entre os dois conjuntos de dados. A inibição não competitiva produz uma mudança de inclinação e K_m permanece mesmo, no entanto V_{max} é afetado.

4.10 - Constante de inibição (K_i):

A constante de inibidor, K_i, é uma indicação do quão potente é um inibidor; é a concentração necessária para produzir metade da inibição máxima.

A constante de inibição para tripsina foi definida segundo o método de Dixon (1953), onde traçando o inverso da velocidade contra a concentração de inibidor a cada concentração de substrato, obtém-se uma família de linhas de intersecção. Para um inibidor competitivo, as linhas convergem acima do eixo x, e o valor de [I] onde elas se cruzam é -K_i.

O resultado representado na figura 23 abaixo sugere que o inibidor isolado seja do tipo não competitivo com valor de K_i de 1nM.

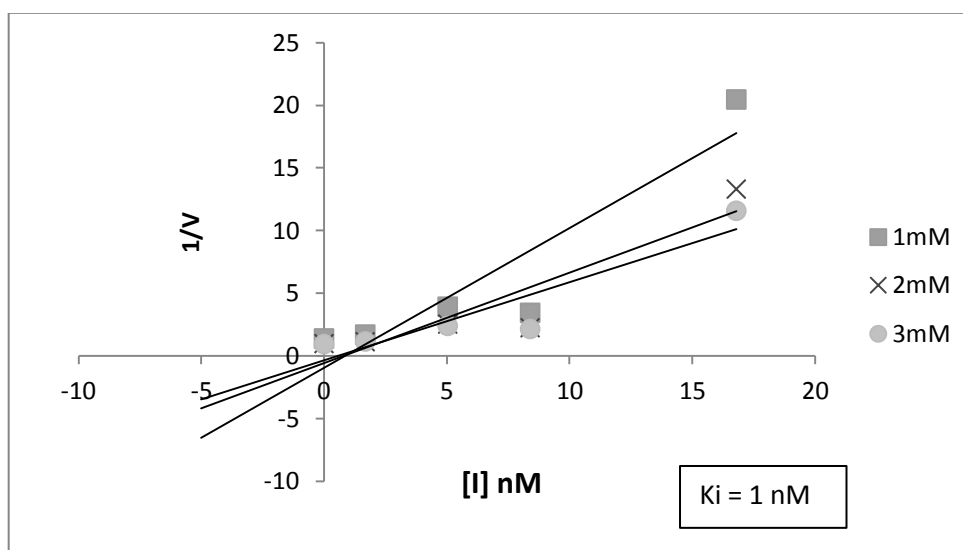


Figura 23 – Determinação da constante de inibição (K_i). O valor de K_i foi obtido pelo duplo-recíproco da velocidade de reação vs a concentração do inibidor sob três diferentes concentrações de BAPNA (1, 2 e 3mM). Este traçado indica que a subfração 1.1 é um inibidor competitivo.

4.11 - Cinética de inibição:

A curva de cinética está apresentada na figura 24 abaixo e apresenta uma curva sem a presença de inibidores e uma curva com 0.42 nM da subfração INPA 1.1, em diferentes concentrações de substrato.

Pode-se observar que em concentrações mais baixa de substrato a inibição é perceptível. No entanto em concentrações maiores (3mM) nota-se a perda do potencial inibitório, sugerindo que neste caso a inibição é do tipo competitiva.

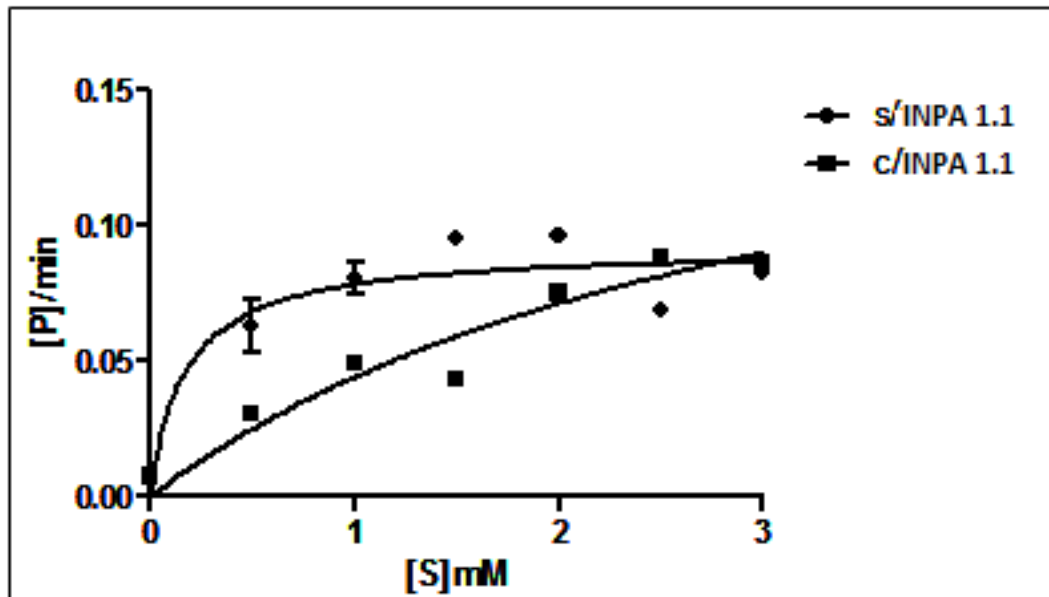


Figura 24: Representação de Michaelis Menten da atividade inibitória contra tripsina da subfração INPA 1.1. ◆ Representa a curva sem inibição e ■ a curva com inibidor. Todos os pontos são experimentais.

4.12 - Espectrometria de massas:

A estrutura primária da fração INPA 1.1 foi determinada por sequenciamento *de novo* após a fragmentação em equipamento LC-MS Orbitrap Elite por infusão direta e analisadas pelo software Peaks Studio 8.0.

Como a massa calculada difere da massa experimental, sugere-se que haja alguma discrepância no sequenciamento e também se sugere que a sequência deste inibidor seja mais semelhante a encontrada por Barbosa (2014), como ilustrado abaixo:

Abaixo os espectros deconvoluídos da fração INPA 1.1 no modo top down.

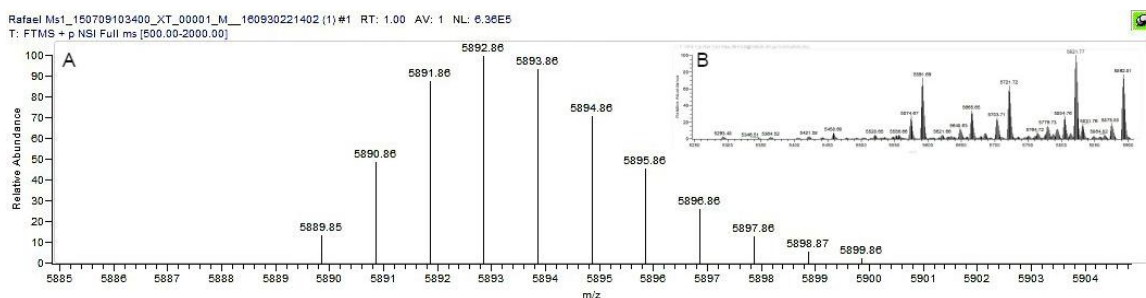


Figura 25 –Espectro deconvoluídos da fração 1.1 em Orbitrap Elite análise top down. **A** – Detalhe da massa monoisotópica (5885 – 5904 m/z). **B** - Espectro total de 2550 – 5900 m/z.

A

10 20 30 40 50
VIEPKCDKNA DMCTDDYTPV CGTDGKNKYSN ECRLCLHNRE TGQNVKIAHR GEC

Number of amino acids: 53
Molecular weight: 5946.62
Theoretical pI: 5.50

B

INPA1.1 VIEPKCDKNADMCTDDYTPVCGTDGKNKYSNECRLLCLHNRETGQNVKIAHRGEC
EDER12 IIEPKCSRYPISICTFGPNAVCGTDGKKYFNECTLCVINRKNGKEVKIEKYGAC
:*****.: .:** . . *****:** ** ** *: **: *::** : * *

Figura 26 – A) cálculo da massa teórica da subfração 1.1 diferente em aproximadamente 57 m/z da massa monoisotópica obtida experimentalmente. C) comparação ente a sequência encontrada neste estudo e a sequência ‘inibidor enzimático 12’ Barbosa (2014).

4.13 - Sequenciamento de novo:

Com o objetivo de obter a sequência primária do inibidor, três conjuntos de peptídeos foram produzidos pela digestão do inibidor carboximetilado com Tripsina, Glu-C e Quimotripsina. O conjunto resultante de peptídeos foi analisado por LTQ Velos Orbitrap.

Os dados MS / MS foram processados automaticamente e o sequenciamento de novo foi executado usando o software Novor (Ma, 2015).

Usando o software Peaks, para as sequencias obtidas pela digestão com Glu-C, identificou-se uma sequência com 67% de cobertura como mostrado na figura 27 abaixo. As proteínas encontradas no sequenciamento apresentam o peptídeo sinal parcialmente sequenciado (estima-se que sejam os dezenove primeiros resíduos da esquerda para a direita), no entanto, vale ressaltar que para todos os ensaios realizados neste estudo utilizou-se o peptídeo maduro.

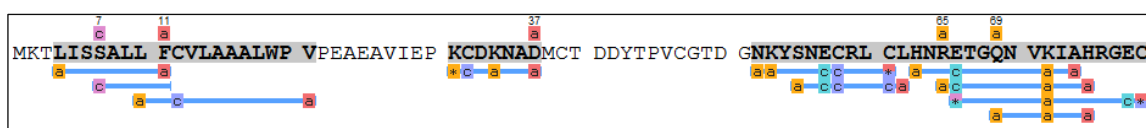


Figura 27 – Sequenciamento de novo pelo software Peaks 8.0. Os peptídeos em cinza possuem alta confiança e as barras azuis apresentam as áreas sequenciadas.

Além disso, esta sequência apresenta alta similaridade com PSKP-I de *P. sauvagii* por Clustal Omega.

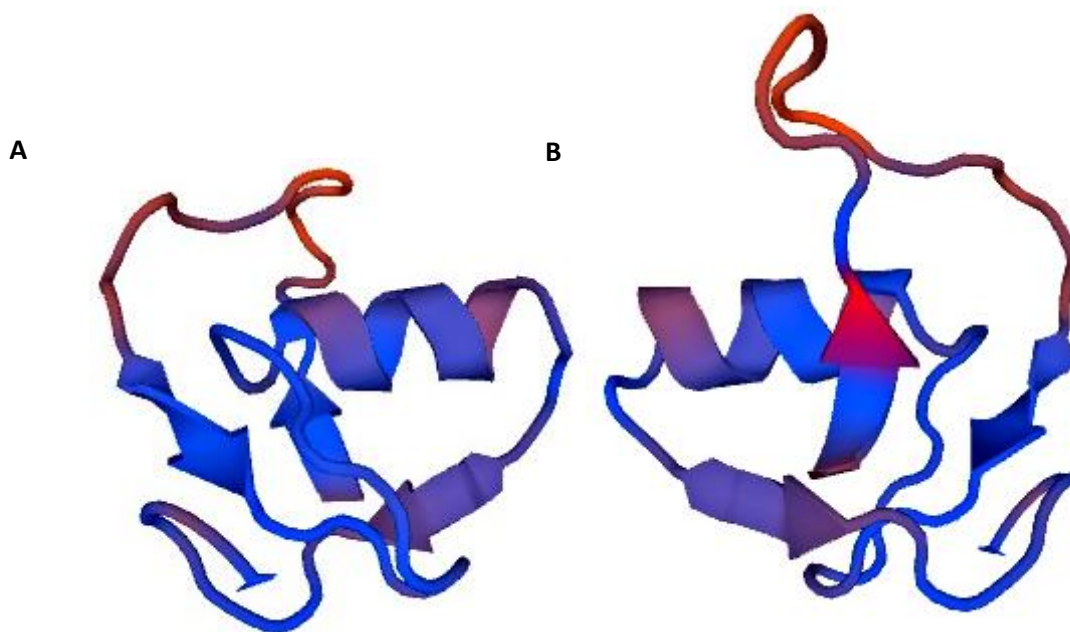
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

INPA          VIEPKCDKN-ADMCTDDYTPVCGTDGNKYSNECRLCLHNRETG----QNVKIAHRGEC
PSKP1-Pnordestina VIEPKCDKN-ADMCTDDYTPVCGTDGNKYSNECRLCLHNRETG----QNVKIAHRGEC
PSKP1-Psauvagi  VIEPKCYKYEGKKCPPDINPVCGETDKRTYYNECALCVFIRQSTKKADKAIKIKKWKGC
***** * .. * * ,***** ..* *** **: . *:: : : ** : *:*
  
```

Figura 28 – Alinhamento por Clustal Omega do peptídeo maduro na subfração 1.1 (INPA) com o peptídeo maduro de PSPK-I de *P. nordestina* e PSKP-1 de *P. sauvagii*.

A partir da estrutura primária sugere-se que a subfração 1.1 seja um inibidor tipo kazal, e é possível observar pela predição da estrutura terciária que existem indícios que o inibidor caracterizado neste trabalho seja tipo kazal como, por exemplo, uma α -hélice central e três folhas β -antiparalelas), cada possuindo entre 50-60 aminoácidos com seis cisteínas conservadas, que formam três pontes de dissulfeto, como ilustrado na figura 29 abaixo.



29 - Predição da estrutura terciária da subfração 1.1 pelo software online SWISS-MODEL. A) vista frontal e B) vista posterior da subfração 1.1.

Ainda observando os inibidores tipo kazal já identificados em anfíbios, ao compará-los em uma árvore filogenética, observa-se que o inibidor isolado neste trabalho se assemelha mais aos inibidores de *P. sauvagii*, pertencentes à família Phyllomedusidae, quando comparado com *A. callidryas*, pertencente à família Hylidae, como mostrado na figura 30 abaixo.

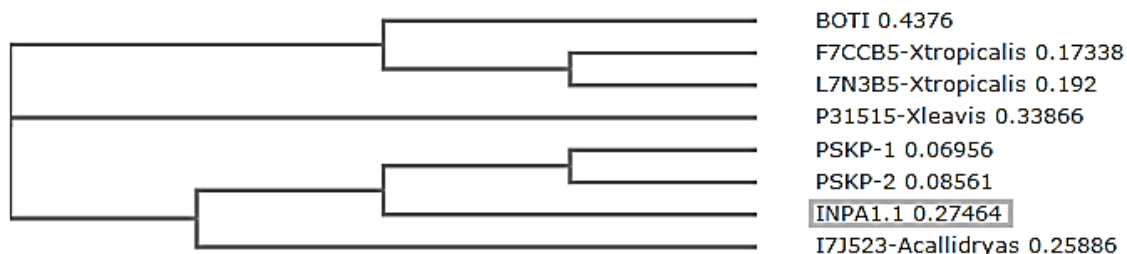


Figura 30 – Arvore filogenética de inibidores do tipo kazal encontrados em anfíbios. BOTI (*Bombina orientalis* trypsin inhibitor), F7CCB5 (inibidor kazal-like de *Xenopus tropicalis*), L7N3B5 (inibidor kazal-like de *X. tropicalis*), P31515 (inibidor kazal-like de *X. leavis*), I7J523 (*Agalychnis callidryas* trypsin inhibitor), PSKP-1 (inibidor de protease de *Phyllomedusa sauvagei* 1), PSKP-2 ((inibidor de protease de *Phyllomedusa sauvagii* 2) e INPA 1.1 (inibidor de tripsina de *Phytocopus azureus*).

4.14 – Ensaio de viabilidade celular por MTT

Após a avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT, verificou-se que ambas linhagens se mostraram pouco sensíveis à incubação com a subfração nas concentrações testadas.

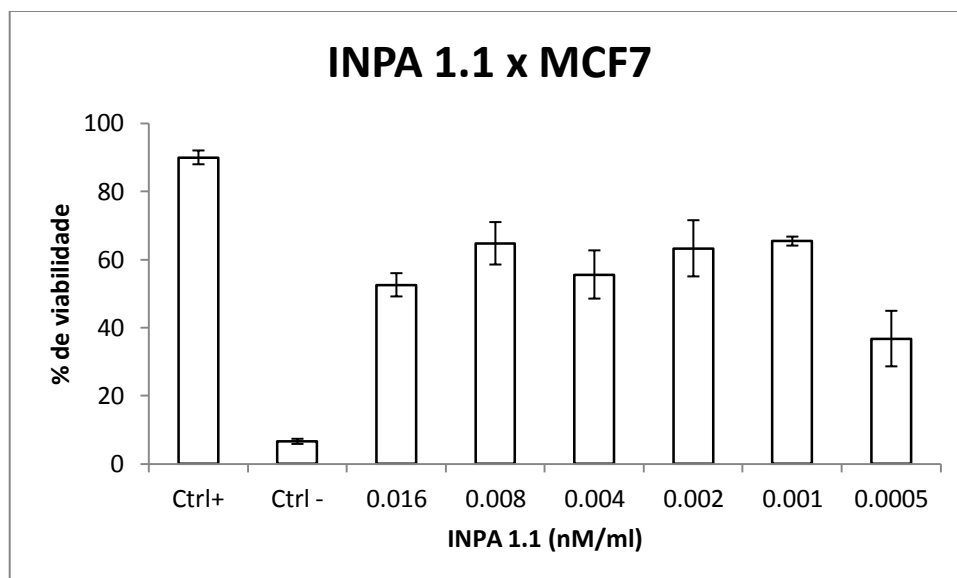


Figura 31 - Efeito da subfração 1.1 na viabilidade das células MCF7. Células de duas linhagens foram incubadas com diferentes concentrações da fração por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média ± erro padrão.

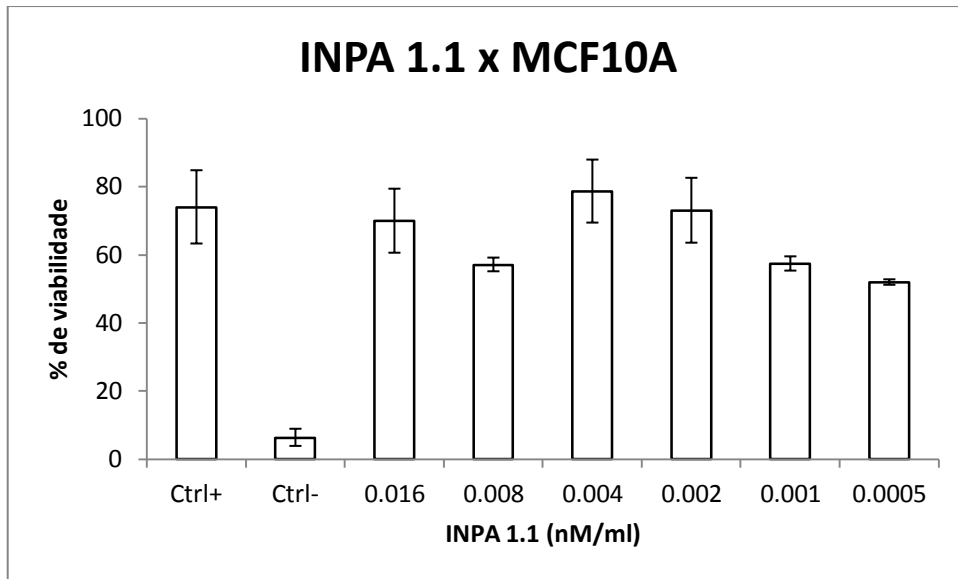


Figura 32 - Efeito da subfração 1.1 na viabilidade de células MCF10A. Células foram incubadas com diferentes concentrações da fração por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média ± erro padrão.

4.15 - Atividade hemaglutinante

A confirmação da atividade hemaglutinante foi feita por visualização da formação, posterior a uma hora de incubação, de uma malha ou rede de hemácias que cobre o fundo dos poços. Por outro lado, foram considerados negativas as amostras onde se formou um botão compacto de células no fundo do poço, conforme a figura 30.

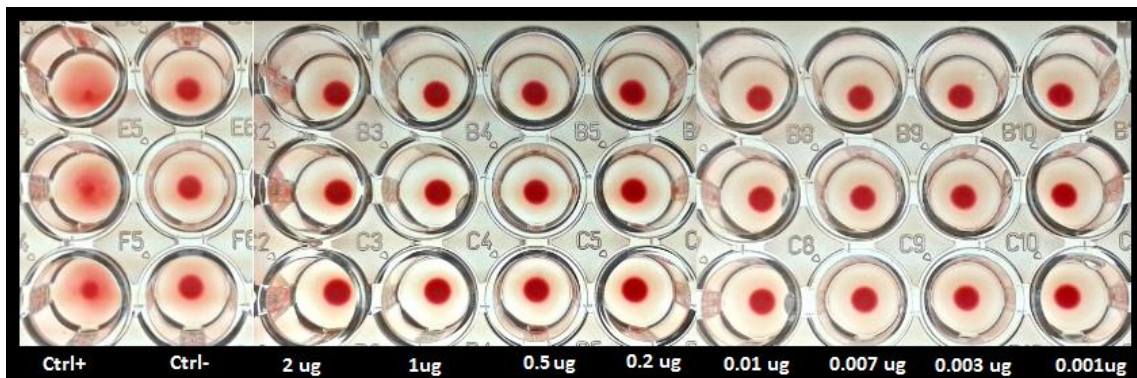


Figura 33 – Avaliação da atividade hemaglutinante da subfração 1.1 de *Pithecopus azureus*. o controle positivo contém lectina 1.9mg/ml e o controle positivo somente eritrócitos com salina sem qualquer conteúdo proteico. Da esquerda para a direita, estão os poços representando a subfração 1.1 nas concentrações 2-0.002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente.

Assim sendo, pode-se sugerir que a subfração 1.1 não provoca a aglutinação de eritrócitos até 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

5 – Discussão:

A família Phyllomedusidae se destaca entre os anfíbios por ser uma rica fonte de peptídeos antimicrobianos (PAMs), e esses peptídeos estão agrupadas em famílias de acordo com a similaridade: Dermaseptinas, Phylloseptinas, Plasticininas, Dermatoxinas, e Phylloxinas (Amiche et al 2008).

Além dos peptídeos antimicrobianos, existe outra classe de peptídeos importantes como os inibidores de proteases, que atuam ligando-se às proteases impedindo a sua função, e inativando-as. (Paula et al., 2012).

Os IP's possuem um grande potencial biotecnológico. Alguns exemplos bem-sucedidos de terapias que fazem uso destes peptídeos incluem inibidores da enzima conversora angiotensina (IECAS) no tratamento de hipertensão, onde a inibição desta enzima impede a formação de angiotensina II e III (potentes vasopressores diretos ou indiretos) e impede a inativação das bradicininas (potentes vasodilatadores) (Cushman et al., 1978).

A utilização de inibidores de protease do HIV na prevenção do desenvolvimento da AIDS, onde tais inibidores atuam impedindo que a protease do HIV-1 processe o precursor p55 e p160, que são responsáveis pela formação do capsídeo viral, dos precursores da transcriptase reversa e da proteína de integração (Mcquadeet al., 1990). Ainda sobre a aplicação de inibidores de protease do HIV-1, seu uso em estudos para o desenvolvimento de tratamentos de mieloma múltiplo (MM), tem demonstrado que os inibidores de protease do HIV-1 induzem as células de MM a ficarem aprisionadas na fase G2 do ciclo celular juntamente com a diminuição na expressão da proteína Mcl-1, uma das responsáveis pela resistência a apoptose nestas células (Ikezoe et al., 2004; Scott & Taggart, 2010). Um outro estudo realizado com inibidores de protease da família Bowman-Birk em células de fibroblasto embrionário da linhagem C3H/10T½ transformadas com radiação e em camundongos com predisposição a desenvolver tumores de cólon e intestino, demonstrou uma diminuição na carcinogênese tanto para os experimentos *in vitro* quanto *in vivo* (Yavelow et al., 1985; Kennedy et al., 1996).

Estudos realizados com Alzheimer demonstraram a presença de um inibidor de protease denominado α 1-antiquimiotripsina, e que estaria associado com um precursor de proteína amiloide (APP), proteína esta que apresenta um grande acúmulo nas placas senis em casos de Alzheimer. Uma das hipóteses levantadas seria que tais inibidores auxiliariam no aumento da quantidade de proteínas β -amiloide, protegendo tais proteínas de serem degradadas por serinoproteases ou pela geração de APP's diferentes após o metabolismo do precursor APP-IP (Abraham et al., 1988; Tanzi et al., 1988). A compreensão dos mecanismos e função de tal inibidor podem representar um avanço no tratamento desta doença.

A maior parte dos trabalhos que se propõem a isolar inibidores de protease de anfíbios utiliza uma pré-separação em colunas de filtração em gel. O presente trabalho utilizou como

primeiro passo de purificação uma coluna analítica apresentando uma boa resolução e sem perda de atividade.

O inibidor isolado neste trabalho (INPA 1.1) apresenta atividade inibitória apenas para tripsina e baixa atividade para quimotripsina. A diferença de resultados observada para diferentes substratos pode se dar, pois, geralmente os substratos sintéticos produzem atividades inibidoras mais altas que as proteínas naturais. Fritz et al.(1968) explicam esse fenômeno sugerindo que os substratos naturais maiores são mais difíceis de deslocar do sítio ativo para formar o complexo enzima-inibidor. Se correto, isso sugere que, embora o uso de substratos sintéticos seja um meio mais preciso de determinar o teor de inibidores de materiais, o uso de substratos naturais produzirá um valor que tem maior relevância fisiológica.

Atualmente, o papel biológico dos peptídeos inibidores de protease em peles de anfíbios é explicado principalmente por duas hipóteses. Uma é que várias enzimas estão envolvidas no processamento de precursores peptídicos ou na degradação de peptídeos na pele e os inibidores de proteinase modulam negativamente a atividade destas proteases para evitar a degradação ou liberação prematura de peptídeos de pele. A outra hipótese é que os peptídeos são agentes anti-infecciosos de superfície semelhantes aos PAMs pois inibem proteases extracelulares produzidas por bactérias invasoras. (Mignogna et al. 1996).

A subfração INPA 1.1 não apresentou atividade inibitória de crescimento para *S. aureus* e *E. coli* nas concentrações utilizadas, resultado que suporta os dados presentes na literatura, demonstrando que os antimicrobianos são mais hidrofóbicos e eluem por último na cromatografia (Brand et al., 2013; Conceição et al., 2006; Batista et al., 1999). O inibidor KPHTI também não possui atividade antimicrobiana, o que sugere que estes inibidores tenham função de proteger os peptídeos bioativos de serem degradados (Shaw & Chen, 2003).

Foi investigada a estabilidade da atividade inibitória de tripsina da subfração INPA 1.1 em diferentes pHs e temperaturas. O inibidor manteve sua atividade em todas as temperaturas e pHs testados por 45 minutos. Diferentemente do inibidor KPHTI de *Kaloula pulchra haiana* que reteve mais de 80% da sua atividade até 50 C durante 20 min, mas houve uma perda de atividade de 50% e 80% a 70°C e 90°C, respectivamente. O inibidor KPHTI pré-incubado em pH de 2,0-8,0 durante 20 min não afetou a inibição da tripsina. Mas no intervalo de 8,0-10,0, a atividade inibitória da tripsina do KPHTI diminuiu substancialmente.

Apesar da estabilidade em diferentes pHs e temperaturas, a atividade inibitória da subfração 1.1 foi afetada pela incubação com o agente redutor DTT (1, 10 e 100 mM). Resultado muito semelhante como observado para KPHTI. Os resultados sugerem que as pontes dissulfeto intramoleculares podem ser responsáveis pela estabilidade funcional do inibidor na presença de vários desnaturantes físicos, tais como temperatura e pH, mas não tão estáveis a agentes desnaturantes químicos como o DTT.

O mecanismo mais estudado dos inibidores de serino proteases é o mecanismo padrão (ou mecanismo canônico). Estes inibidores incluem a família Kazal, Kunitz e Bowman-Birk de inibidores e liga-se de modo de chave-fechadura. Inibidores de mecanismo padrão inserem um loop reativo no sítio ativo da protease, de um modo semelhante a um substrato.

A grande maioria dos inibidores de protease são inibidores competitivos. Apesar de alvos divergentes e diferentes mecanismos de inibição, a maioria dos inibidores de protease se ligam a uma porção crítica do inibidor no sítio ativo de um modo semelhante a um substrato. Este é um paradigma eficaz para uma inibição potente, isso porque proteases relacionadas apresentam frequentemente um alto grau de homologia no sítio ativo, e um inibidor com a ligação semelhante a um substrato frequentemente, podem potentemente inibir mais de uma protease (Rawlings et al., 2010).

O INPA 1.1 apresentou efeito sobre a velocidade dependente da concentração bem como uma representação duplo-recíproca típica de um inibidor do tipo não competitivo. Inibidores não competitivos podem apresentar uma inibição do tipo mista. Uma inibição mista também se liga em um sítio diferente do sítio de ligação do substrato, pode se ligar e bloquear tanto E quanto ES, e, portanto, altera tanto V_{max} como K_m .

Além disso a subfração INPA 1.1 apresentou um K_i de 1 nM, considerado muito mais ativo quando comparado com outros anfíbios como de *A. callydrias* (1,9nM), *B. bombina* (0,1-1uM), *B. microdeladigitora* (0,2 uM), *Bufo andrewsi* (14nM), e *H. versabilis* (19nM), por exemplo. Sendo assim possui uma afinidade maior e mais estável com a tripsina e muito mais ativo do que os inibidores isolados de outras famílias de anfíbios.

A maior parte dos inibidores isolados de anfíbios tem uma faixa entre 1000 e 11000 Da com algumas poucas exceções de inibidores em maiores faixas de massa. No presente trabalho o inibidor caracterizado apresenta massa de 5889 m/z... Seguindo o padrão de inibidores descritos na literatura, o inibidor isolado da secreção de *P. azureus* obtido pelo sequenciamento *de novo* apresenta três pontes no peptídeo maduro. Observando a similaridade de massa entre o inibidor isolado neste trabalho e o inibidor ACKTI de *A. callydrias* sugere-se que haja similaridade estrutural entre inibidores de espécimes da mesma família, além da proximidade evolutiva entre estas moléculas, assim como foi observado pela árvore filogenética apresentando maior proximidade com outros Phyllomedusidae em relação aos Hylidae.

Um domínio Kazal típico ou canônico é composto por 40-60 resíduos de aminoácidos incluindo alguns aminoácidos de espaçamento. Geralmente, os domínios Kazal dos vertebrados são ligeiramente maiores do que os invertebrados, mas sua arquitetura é bastante semelhante. O motivo Kazal tem uma sequência de aminoácidos geral de C-Xa-C-Xb-PVCG-Xc-Y-Xd-C-Xe-C-Xf-C onde os subscritos a, b, c, d, e f são números inteiros de resíduos de aminoácidos. Dentro do domínio de Kazal existem seis resíduos de cisteína bem conservados capazes de formar três ligações dissulfeto entre as cisteínas 1-5, 2-4, 3-6

resultando numa estrutura tridimensional característica. Há uma α -hélice rodeada por uma folha beta adjacente tripla e laços de segmentos peptídicos. O anel do sítio ativo convexo é prolongado para fora proporcionando acesso fácil para o sítio ativo da protease se encaixar e, em seguida, ficar preso (Rimphanitchayakit & Tassanakajon, 2010). A partir da sequência primária encontrada, obtivemos uma predição em silico da estrutura secundária desta proteína, sugerindo que a subfração 1.1 de *P. azureus* seja um inibidor de serino protease pertencente à família Kazal.

Ainda quando comparada a estrutura primária das proteínas maduras da subfração 1.1 com PSKP-1 de *P. sauvagii*, é possível observar a alta similaridade entre elas reforçando a sugestão de que pertençam à mesma família de inibidores.

A PSKP-1 exibe atividade bactericida e induz a aglutinação de eritrócitos e bactérias, diferentemente dos resultados encontrados para *P. azureus* não possui atividade aglutinante para eritrócitos e nenhuma atividade antibacteriana. Além disso, a subfração isolada apresentou baixa inibição de crescimento para células MCF7 e MCF10A, o que suporta a ideia que estes inibidores tenham função na regulação da atividade proteasica. Apesar da subfração 1.1 não ter apresentado resultado positivo para as atividades biológicas testadas é possível explorar outras possibilidades como atividade antifúngica, antiviral ou mesmo ensaios de sinergismos com os peptídeos antimicrobianos de *P. azureus*.

Além da subfração 1.1, neste estudo também foi purificada e parcialmente caracterizada a subfração 3.1 que apresenta alta atividade inibitória de tripsina e massa de aproximadamente 4700 m/z. Apesar de não ter sua sequência elucidada, acredita-se que os inibidores de tripsina presentes na secreção de *P. azureus* tenham alta similaridade estrutural e que a diferença de massas seja dada pela troca de resíduos de aminoácidos, sendo necessários maiores estudos para confirmar esta hipótese.

Ao longo dos anos os inibidores de protease têm se mostrado uma classe de moléculas com amplo potencial no combate a doenças infecciosas, em especial as de origem viral e mesmo o câncer. Isso porque os inibidores de proteases começaram a receber especial destaque como quimioterápicos, a partir do emprego de bloqueadores de aspartilproteases no tratamento de indivíduos HIV positivos. Atualmente, vários inibidores têm sido desenvolvidos e avaliados quanto a possível utilização no tratamento de patologias como hipertensão, diabetes, trombose, osteoporose, câncer e doenças infecciosas (Zucca et al., 2011).

Por serem moléculas direcionadas contra as enzimas responsáveis pela virulência de vários agentes patogênicos, os inibidores têm sido vistos como uma das estratégias mais promissoras no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos em muitas infecções parasitárias, cujo maior benefício é eliminar o microorganismo patogênico sem causar efeitos colaterais no hospedeiro (Mckerrow et al., 1999; Rosenthal et al., 1993; Engel et al., 1998; Doyle et al., 2007).

Sendo assim, os IP's possuem um grande potencial farmacológico e biotecnológico, com possíveis aplicações na regulação de processos fisiológicos, no combate a micro-organismos e na inibição de atividade viral e no tratamento de diversas patologias. Devido a estas características e a constante descoberta de novos IP's na secreção de anfíbios, a busca e caracterização de novos inibidores de origem natural nestes animais criam possibilidades para o desenvolvimento de novos fármacos.

6- Conclusões:

Pelos resultados obtidos neste projeto é possível concluir que:

1. Existem pelo menos seis inibidores de serino proteases na secreção cutânea de *Pithecopus azureus*.
2. Um destes inibidores foi purificado, nomeado como INPA 1.1 e apresenta atividade inibitória para tripsina e baixa atividade inibitória de quimotripsina, além de uma massa monoisotópica de 5898 m/z.
3. Além disso, este inibidor apresentou alta estabilidade em diferentes faixas de pH e temperatura, no entanto, baixa estabilidade ao agente redutor DTT.
4. Este inibidor apresenta inibição do tipo não competitiva e K_i de 1 nM.
5. O inibidor de protease isolado neste trabalho não apresentou atividade antimicrobiana e não apresentou atividade antiproliferativa para MCF7 e MCF10A.
6. O inibidor de protease isolado neste trabalho não apresentou atividade hemaglutinante entre 2-0.ug/ μ l.
7. O sequenciamento de novo elucidou 53 resíduos de aminoácidos, incluindo o peptídeo sinal, o que representa 67% de cobertura proteica.
8. A partir da estrutura primária e predição da estrutura terciária é possível inferir que o inibidor isolado pertença à família Kazal.

7- Perspectivas:

- 1- Avaliar o potencial inibitório para proteases não serínicas.
- 2- Avaliar o potencial sinérgico dos inibidores com os peptídeos antimicrobianos de *P. azureus*.
- 3- Avaliar a interação inibidor-tripsina por meio da ressonância plasmônica de superfície.
- 4- Avaliar o potencial antifúngico dos inibidores presentes na secreção cutânea de *P. azureus*.
- 5- Realizar o dicroísmo circular para total elucidação da estrutura secundária.
- 6- Realizar a predição a interação entre o inibidor isolado e a tripsina *in silico*.

8- Referências bibliográficas:

ALI, M.F.; LIPS, K.R.; KNOOP, F.C.; FRITZSCH, B.; MILLER, C.; CONLON, J.M. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1601, 55–63, 2002.

AMICHE, M., LADRAM, A. and NICOLAS, P. A consistente nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. *Peptides* 29 (11): 2074-2082, 2008.

BARRA, D. & SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends biotechnol.* 13:205–209, 1995.

BATISTA, C.V.F., ROSENDO DA SILVA, L., SEBEN, A., et.al. Antimicrobial peptides from the brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides*, 20, 679-686, 1999.

BERG, JEREMY M., TYMOCZKO, JOHN L., AND STRYER, LUBERT. *Biochemistry*. 6th ed. New york, n.y.: w.h. Freeman and company, 229, 2007.

BISHOP, P.; MARKUS, D. J; PEARCE, G.; RYAN, C. A. Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell-walls. *Proceedings of the national academy of science of the usa*, v. 78, n. 6, p. 3536-3540, jun. 1981.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interactions with proteinases. *European journal of biochemistry*, v. 204, n. 2, p. 433-451, 1992.

BRAND, G.D., LEITE, J.R., SILVA, L.P., ALBUQUERQUE, S., PRATES, M.V., AZEVEDO, R.B. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. *Anti-Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J. Biol. Chem* 277: 49332-49340, 2002.

BRAND, G.D., KRAUSE, E.C., SILVA, L.P. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 27(9): 2137-2146, 2006.

BRAND, G.D., SANTOS, R.C., ARAKE, L.M., et.al., The skin secretion of the amphibian *Phyllomedusa nordestina*: A source of antimicrobial and antiprotozoal peptides. *Molecules*, 18, 7058-7070, 2013.

CHEN, T.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of novel Trypsin inhibitor analogs from the dermal venom of the oriental fire-bellied toad (*Bombina orientalis*) and the european yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). *Peptides*, 24, 873–880, 2003.

CHEN, Y. W., HUANG, S.C., LIN-SHIAU, S. Y. E LIN, J.K. Bowman-birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of mcf7 breast cancer cells through accumulation of map kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*, v.26, p. 1296-306, 2005.

CHRISTENSEN S., VALNICKOVA Z., THOGERSEN I. B., PIZZO S. V., NIELSEN H. R., ROEPSTORFF P., ENGHILD J. J. Sodium dodecyl sulfate-stable complexes between serpins and active or inactive proteinases contain the region cooh-terminal to the reactive site loop. *J. Biol. Chem.* 270:14859–14862, 1995.

CLEMENTE, A., MORENO, F.J., MARIN-MANZANO MDEL, C., JIMENEZ, E., E DOMONEY, C. The cytotoxic effect of bowman-birk isoinhibitors, ibb1 and ibb2, from soybean (*Glycine max*) on ht29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Molecular nutrition & food research*, v. 54, p. 396-405, 2009.

CONCEIÇÃO K, KONNO K, RICHARDSON M, ANTONAZZI MM, JARED C, DAFFRE S, CAMARGO ACM, PIMENTA DC (2006) Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides*, 27 (12): 3092-3099, 2006.

CONLON, J. M, AND JOSEPH B. K. A protease inhibitor of the kunitz family from skin secretions of the tomato frog, *Dyscophus guineti* (microhylidae). *Biochemical and biophysical research communications* 279 (3): 961-964, 2000.

CONLON, J.M., AL-GHAFFER, N., ABRAHAM, B., LEPRINCE, J. Strategies for development of naturally occurring antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods*, 42: 349-357, 2007.

CUSHMAN, D. W., CHEUNG, H.S., SABO, E. F., ONDETTI M. A. Design of new antihypertensive drugs: potent and specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme." *progress in cardiovascular diseases* 21 (3): 176-182, 1978.

DITTMANN, K.H., MAYER, C. E RODEMANN, H.P. Radioprotection of normal tissue to improve radiotherapy: the effect of the bowman-birk protease inhibitor. *Current medicinal chemistry - anticancer agents*, v. 3, p. 360-363, 2003.

DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants *Biochem J.* 1953 Aug; 55(1): 170–171.

DOYLE PS, ZHOU YM, ENGEL JC, MCKERROW JH. Cysteine protease inhibitor cures Chagas disease in an immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3932–3939.

EL AMRI C, LACOMBE C, ZIMMERMAN K, LADRAM A, AMICHE M, NICOLAS P, BRUSTON F (2006) The plasticins: membrane adsorption, lipid disorders, and biological activity. *Biochemistry* 45:14285–14297.

ENGEL JC, DOYLE PS, PALMER J, HSIEH I, BAINTON DF, MCKERROW JH. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci.* 1998 Mar;111 (Pt 5):597-606.

ERLANGER B. F., KOKOWSKY N., COHEN W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem.* 1961; 95: 271

FREITAS, S. M., IKEMOTO, H. AND VENTURA, M. M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (btci). *Journal of protein chemistry* 18 (3): 307-313, 1999.

FREITAS, E.B., DE-CARVALHO, C.B., FARIA, R.G., BATISTA, R.C., BATISTA, C.C., COELHO, W.A., BOCCHIGLIERI, A. Nicho ecológico e aspectos da história natural de *Phyllomedusa azurea* (anura: hylidae, phyllomedusinae) no cerrado do Brasil central. *Biota neotrop.* 8(4): 2003.

FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, L., HAENDLE, H., WERLW, R. Chemistry and biochemistry of proteinase inhibitors from mammalian tissues. In: *Chemistry, pharmacology and clinical applications of proteinase inhibitors.* Acad. Sci. 146, 400, 1968.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Phyllomedusidae/Pithecopus/Pithecopus-azureus1>>. Acesso em: 12 nov. 2016.

GEBHARD, L.G.; CARRIZO, F.U.; STERN, A.L.; BURGARDT, N.I.; FAIVOVICH, J.; LAVILLA, E.; ERMACORA, M.R. A kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*. *Eur. J. Biochem.*, 271, 2117–2126, 2004.

GODFREY, T.; S.WEST. *Industrial enzymology*, 2. Ed. New york: macmillan publishers inc., p. 609, 1996.

GRZONKA Z, JANKOWSKA E, KASPRZYKOWSKI F, KASPRZYKOWSKA R, LANKIEWICZ L, WICZK W, WIECZERZAK E, CIARKOWSKI J, DRABIK P, JANOWSKI R, KOZAK M, JASKÓLSKI M, GRUBB A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta biochim pol* 48 (1): 1-20, 2001.

HAIDER, S.R., REID, H.J., AND SHARP, B.L. Tricine - sds page. Chapter 8, protein electrophoresis: methods and protocols, methods in molecular biology, vol. 869, 2012.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews* 102 (12): 4501-4524, 2002.

JOANITTI, G. A., AZEVEDO, R. B. e FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by anticarcinogenic bowman-birk protease inhibitor from *Vigna unguate* seed. *Cancer letters*, v. 293, p. 73-81, 2010.

KAKADE, ML; SIMONS, N; LIENER, IE; Na evaluation natural VS synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chem.* 1969; 46:518-526.

LAI, R.; LIU, H.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of chinese red-belly toad *Bombina maxima*. *Comp. Biochem. Physiol. B biochem. Mol. Biol*, 131, 47–53, 2002.

LAI, R., YAN, X., LIU, H., YANG, X., CHE, Q., LIU, R., YANG, H., LIU, X., YOU, D., WANG, A., LI, J. Bi-functional peptides with both trypsin-inhibitory and antimicrobial activities are frequent defensive molecules in ranidae amphibian skins. *Amino acids*, 43, 309-316, 2011.

LASKOWSKI, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annual review of biochemistry*, v. 49, p. 593-626, jul. 1980.

LEITE JRSA, SILVA LP, RODRIGUES MI, PRATES MV, BRAND GD, LACAVALA BM, AZEVEDO RB, BOCCA AL, ALBUQUERQUE S, BLOCH C JR (2005) Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. *Peptides* 26:565–573.

LI, J.; WU, J.; WANG, Y.; XU, X.; LIU, T.; LAI, R.; ZHU, H. A small trypsin inhibitor from the frog of *Odorrana grahmi*. *Biochimie*, 90, 1356–1361, **2008**.

LI, R.; WANG, H.; JIANG, Y.; YU, Y.; WANG, L.; ZHOU, M.; ZHANG, Y.; CHEN, T.; SHAW, C. A novel kazal-type trypsin inhibitor from the skin secretion of the central american red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*. *Biochimie*, 94, 1376–1381, **2012**.

LINEWEAVER, H; BURK, D. (1934). "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society*. **56** (3): 658–666.

LOPES, J. L. S. Purificação e investigação de propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos das sementes de *Acácia plumosa lowe*. Dissertação de mestrado, instituto de física de são carlos, universidade de São Paulo, São Carlos. Recuperado em 2014-11-25, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-18092007-112855/structural studies of cysteine proteases and their inhibitors>, 2006.

LORIN C, SAIDI H, BELAID A, ZAIRI A, BALEUX F, HOCINI H (2005) The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology* 334:264–275.

LOSSO, J.N. The biochemical and functional food properties of the bowman-birk inhibitor. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 48, p. 94-118, 2008.

LU, X.; MA, Y.; WU, J.; LAI, R. Two serine protease inhibitors from the skin secretions of the toad, *Bombina microdeladigitora*. *Comp. Biochem. Physiol. B biochem. Mol. Biol.*, 149, 608–612, 2008.

MA, B. NOVOR: real-time peptide de novo sequencing software.. [S.l.]: J Am Soc Mass Spectrom., 2015.

MCKERROW JH, ENGEL JC & CAFFREY CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections, *Bioorg. Med. Chem.*, 7: 639- 44, 1999

MCQUADE TJ, TOMASSELLI AG, LIU L, KARACOSTAS V, MOSS B, SAWYER TK, HEINRIKSON RL, TARPLEY WG. A synthetic hiv-1 protease inhibitor with antiviral activity arrests HIV-like particle maturation. *Science* 247 (4941): 454-456, 1990.

MIGNOGNA, G.; PASCARELLA, S.; WECHSELBERGER, C.; HINTERLEITNER, C.; MOLLAY, C.; AMICONI, G.; BARRA, D.; KREIL, G. BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes. *Protein sci*, 5, 357–362, 1996.

MORIHARA, K.; ODA, K. Microbial degradation of proteins. In: guenther, w. (ed.). *Microbial degradation of natural products*. Weinheim, germany: vch publishers. p. 293-364, 1993.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBBEN, A. & CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and peptide letters*. 10:227–238, 2003.

NEIVA, M.; VARGAS, D.C.; CONCEIÇÃO, K.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; ASSAKURA, M.T.; JARED, C.; HAYASHI, M.A. Gene expression analysis by ests sequencing of the brazilian frog *Phyllomedusa nordestina* skin glands. *Toxicon*, 61, 139–150, 2013.

NELSON, D. L. & COX, M.M.. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 3ª edição. Editora sarvier, São Paulo, Brasil. Isbn: 85-7378-125-4, 2002.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (eds.). *Proteolytic enzymes - a practical approach*. Oxford: jrl press. 259 p. , 1990.

OLIVA ML, SALLAI RC, SAMPAIO CA, FRITZ H, AUERSWALD EA, TANAKA AS, TORQUATO RJ, SAMPAIO MU. Bauhinia serine proteinase inhibitors: effect on factor x, factor xii and plasma kallikrein. *Immunopharmacology may* 32(1-3):85-7, 1996.

PAULA, C. A. A.; COULSON-THOMAS, V. J.; FERREIRA, J. G.; MAZA, P. K.; SUZUKI, E.; NAKAHATA, M.; NADER, H. B.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. *Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor (ecti), a plant proteinase inhibitor, decreases in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of src protein-focal adhesion kinase (fak) signaling pathways. *Journal of biological chemistry, maryland*, v. 287, n. 1, p. 170-182, 2012.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein science*, v. 4, n. 3, p. 337-360, mar. 1995.

PESATI, A.R; OLIVEIRA, B.M; OLIEIRA, A.C; POMPEU, D.G; GONÇALVES, D.B; MARANGONI, S; SILVA, J.A; GRANJEIRO,P.A. Extraction, purification and characterization of inhibitor of trypsin from *Chenopodium quinoa* seeds. *Food sci technol*. Vol. 35, n° 4, Campinas, 2015.

PIERRE TP, SEON AA, AMICHE M, NICOLAS P (2000) Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/ opioid peptide precursors. *Eur J Biochem* 267:370–378

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochemistry journal*, v. 290, p. 205-218, 1993.

RAWLINGS ND, BARRETT AJ, BATEMAN. Merops: The peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:D227–D233.

RIMPHANITCHAYAKIT, V. & TASSANAKAJON,A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Developmental and Comparative Immunology* 34, 377–386 2010.

ROSENTHAL PJ, LEE GK, SMITH RE. Inhibition of a *Plasmodium vinckei* cysteine proteinase cures murine malaria. *J Clin Invest*. 1993 Mar;91(3):1052–1056.

SADAVA D., HELLER C., ORIANIS GH., PURVES WK., HILLIS D. *Vida: a ciência da biologia - 8ª ed*, vol. 1 - célula e hereditariedade. Porto alegre 2009.

SAITO, T., SATO, H., VIRGONA, N., HAGIWARA, H., KASHIWAGI, K., SUZUKI, K., ASANO, R. E YANO, T. Negative growth control of osteosarcoma cells by bowman-birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. *Cancer letters*, v. 253, p. 249-257, 2007.

SHAW, C. & CHEN, T. Identification and molecular cloning of novel trypsin inhibitor analogs from the dermal venom of the Oriental fire-bellied toad (*Bombina orientalis*) and the European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). *Peptides*, 24, 873-880, 2003.

SHAW, C., WANG, M., WANG, L., CHEN, T., WALKER, B., ZHOU, M., SUI, D., CONLON, J.M. Identification and molecular cloning of a novel amphibian bowman birk-type trypsin inhibitor from the skin of the hejiang odorous frog; *Odorrana hejiangensis*. *Peptides*, 33 (2), 245-250, 2012.

SONG, G.; ZHOU, M.; CHEN, W.; CHEN, T.; WALKER, B.; SHAW, C. Hv-bbi—a novel amphibian skin bowman-birk-like trypsin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372, 191–196, 2008.

SOUZA, L. C. ; CAMARGO, R ; DEMASI, M. ; SÁ, CEZAR MARTINS DE ; FREITAS, S.M . Effects of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitor on Purified 20S Proteasome and MCF-7 Breast Cancer Cells. Plos One **JCR**, v. 9, p. e86600, 2014.

TANG, M., ASAMOTO, M., OGAWA, K., NAIKI-ITO, A., SATO, S., TAKAHASHI, S. E SHIRAI, T. Induction of apoptosis in the LNCAP human prostate carcinoma cell line and prostate adenocarcinomas of sv40t antigen transgenic rats by the bowman-birk inhibitor. Pathology international, v. 59, p. 790-796, 2009.

TOLEDO, R. C. & JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. Comp. Biochem. Physiol. 111:1–29, 1995.

TRAVIS, J.; SALVESEN, G. S. Human-plasma proteinase inhibitors. Annual review of biochemistry, v. 52, p. 655-709, 1983.

WAN, X.S., HAMILTON, T.C., WARE, J.H., DONAHUE, J.J. E KENNEDY, A.R. Growth inhibition and cytotoxicity induced by bowman-birk inhibitor concentrate in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. Nutrition and cancer, v. 31, p. 8-17, 1998.

WAN, X. S., WARE, J.H., ZHANG, L., NEWBERNE, P. M., EVANS, S. M., CLARK, L. C. E KENNEDY, A.R. Treatment with soybean-derived bowman-birk inhibitor increases serum prostate-specific antigen concentration while suppressing growth of human prostate cancer xenografts in nude mice. Prostate, v. 41, p. 243-252, 1999.

WANG, H.; WANG, L.; ZHOU, M.; YANG, M.; MA, C.; CHEN, T.; ZHANG, Y.; ZELLER, M.; HORNSHAW, M.; SHAW, C. Functional peptidomics of amphibian skin secretion: a novel kunitz-type chymotrypsin inhibitor from the african hyperoliid frog, *Kassina senegalensis*. Biochimie, 94, 891–899, 2012.

WARD, O. P. Proteinases. In: fogarty, w. M. (ed.). Microbial enzymes and biotechnology. London: applied science publishers, p. 251-305, 1983.

WU, J.; LIU, H.; YANG, H.; YU, H.; YOU, D.; MA, Y.; YE, H.; LAI, R. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. J. Proteome res., 10, 4230–4240, 2011.

YOU, D.; HONG, J.; RONG, M.; YU, H.; LIANG, S.; MA, Y.; YANG, H.; WU, J.; LIN, D.; LAI, R. The first gene-encoded amphibian neurotoxin. J. Biol. Chem, 284, 22079–22086, 2009.

ZHANG, Y.; WANG, M.; WEI, S. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the skin secretions of *Kaloula pulchra hainana*. Toxicon, 56, 502–507, 2010.

ZHAO, Y.; JIN, Y.; WEI, S.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Toxicon*, 46, 635–640, 2005.

ZHAO, Y.; JIN, Y.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Isolation and preliminary characterization of a 22-kda protein with trypsin inhibitory activity from toad *Bufo andrewsi* skin. *Toxicon*, 46, 277–281, 2005.

ZUCCA M, SAVOIA D (2011) Current developments in the therapy of protozoan infections. *Open Med Chem J* 5:4–10.