

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**“ESTUDOS FUNCIONAIS DE INIBIDORES DE CISTEÍNO
PEPTIDASES DA CANA-DE-AÇÚCAR E
CARACTERIZAÇÃO DE UMA CISTEÍNO PEPTIDASE
DE *SPHENOPHORUS LEVIS*, UMA IMPORTANTE
PRAGA DA CULTURA CANAVIEIRA”**

MARCIA DELLAMANO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Prof. Dr. Richard Charles Garratt

SÃO CARLOS
2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

D357ef

Dellamano, Marcia.

Estudos funcionais de inibidores de cisteíno peptidases da cana-de-açúcar e caracterização de uma cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis*, uma importante praga da cultura canavieira / Marcia Dellamano. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

129 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Biotecnologia. 2. Cisteíno peptidase. 3. Cana-de-açúcar. 4. DNA shuffling. 5. *Sphenophorus levis*. 6. Modelagem molecular. I. Título.

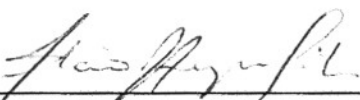
CDD: 660.6 (20^a)

Marcia Dellamano


Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia

Aprovado em: 30/04/2009

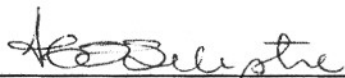
BANCA EXAMINADORA



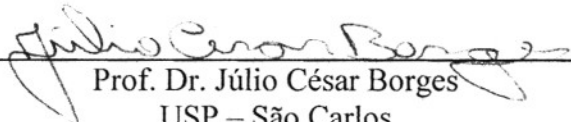
Prof. Dr. Flavio Henrique Silva (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos – DGE/UFSCar




Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
Universidade Federal de São Carlos - DGE/UFSCar



Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo
Universidade Federal de São Carlos - DCF/UFSCar



Prof. Dr. Júlio César Borges
USP – São Carlos



Prof. Dr. Ricardo de Marco
USP – São Carlos

Orientadores:

Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Richard Charles Garratt

Instituto de Física da Universidade de São Paulo- São Carlos

Só peço a você um favor, se puder,
Não me esqueça num canto qualquer.
(o caderno de Toquinho e Mutinho)

I- SÚMULA CURRICULAR

Formação Acadêmica/Titulação

- 2005 - 2009** Doutorado em Biotecnologia.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
Título: “Estudos funcionais de inibidores de cisteíno peptidases da cana-de-açúcar e caracterização de uma cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis*, uma importante praga da cultura canavieira”
Orientadores: Flávio Henrique da Silva e Richard Charles Garratt
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2002 - 2004** Mestrado em Oncologia.
Fundação Antônio Prudente, FAP, São Paulo, Brasil.
Título: Identificação de marcadores moleculares para o câncer de mama por meio da análise da expressão gênica, Ano de obtenção: 2004.
Orientador: Dra Otávia Luisa Silva Damas de Caballero
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1996 - 2000** Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Atuação profissional

Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - ILPC

2000 - 2001 Técnico de pesquisa júnior Regime: Dedicção Exclusiva

Produção bibliográfica:

Artigos completos publicados em periódicos:

Andrea Soares-Costa.; Alcides B. Dias.; Márcia Dellamano.; Fernando Fonseca Pereira de Paula.; Adriana K. Carmona.; Walter R. Terra and Flávio Henrique-Silva. Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. J Insect Physiol. 2011 Jan 20. 2011.

Valadares N. F*.; Dellamano M*.; Soares-Costa, A.; Henrique-Silva F.; Garratt R. C. Molecular determinants of improved cathepsin B inhibition by new cystatins obtained by DNASHuffling. BMC Structural Biology, 30; 10:30. sep 2010.

Montera L, Nicoletti MC, Henrique-Silva F, Dellamano M. ISAS: Interactive software for assisting shuffling process. Neural Network World. v.6(8), p.499-514. 2009.

Folgueira MA, Brentani, H., Katayama ML, Patrao DF, Carraro DM, Mourao Netto M, Barbosa EM, Caldeira JR, Abreu AP, Lyra EC, Kaiano JH, Mota LD, Campos AH, Maciel MS, Dellamano, M, *et al.* Gene expression profiling of clinical stages II and III

breast cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* , v.39, p.1101 - 1113, 2006.

Stolf, B. S., Abreu, C. M., Araujo, M. B. M., Dellamano, M., Martins, W. K., Carvalho, M. B., Curado, M. P., Diaz, J. P., Fabri, A., Brentani, H. Expression profile of malignant and non-malignant diseases of the thyroid gland reveals altered expression of a common set of genes in goiter and papillary carcinomas. *Cancer Letters.* , v.227, p.59 - 73, 2005.

Brentani H, Caballero OC, Camargo AA, AM, S., da Silva WA Jr, Grivet M, Gruber A, Guimaraes PE, Hide W, C, Iseli., Jongeneel CV, Kelso J, Nagai MA, Dellamano, M, *et al.* The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags.. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , v.100, p.13418 - 13423, 2003.

Delatorre P, Smarra AL, Fadel V, Canduri F, Dellamano, M., Bonilla-Rodrigues GO, de Azevedo WF Jr. Purification, crystallization and Patterson search of haemoglobin IV from the armoured catfish *Liposarcus anisitsi*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography.* , v.57, p.1329 - 1331, 2001.

Honda RT, Delatorre P, Fadel V, Canduri F, Dellamano, M., de Azevedo WF Jr, Bonilla-Rodrigues GO. Crystallization, preliminary X-ray analysis and molecular-replacement solution of the carboxy form of haemoglobin I from the fish *Brycon cephalus*.. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* , v.56, p.1685 - 1687, 2000.

Smarra AL, de Azevedo WF Jr, Fadel V, Delatorre P, Dellamano, M., Bonilla-Rodrigues GO, Colombo MF. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of haemoglobin I from the armoured catfish *Liposarcus anisitsi*.. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* , v.56, p.495 - 497, 2000.

Fadel V, Honda RT, Dellamano, M., Smarra AL, Delatorre P, Olivieri JR, Bonilla-Rodrigues GO, de Azevedo WF Jr. Purification, crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of carboxyhaemoglobin-II from the fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* , v.56, p.366 - 367, 2000.

Smarra AL, Fadel V, Dellamano, M., Olivieri JR, de Azevedo WF Jr, Bonilla-Rodrigues GO. Crystallization, preliminary X-ray diffraction analysis and Patterson search of oxyhaemoglobin I from the wolf (*Chrysocyon brachiurus*). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* , v.55, p.1618 - 1619, 1999.

Capítulos de livros publicados

Brait, M., Dellamano, M., Castro, R. M. Alterações cromossômicas do Câncer In: *Oncologia para a Graduação.* 2 ed. São Paulo : Tecmedd, 2008.

Brait, M., Dellamano, M., Castro, R. M. Carcinogênese química e radiação In: *Oncologia para a Graduação.* 2, São Paulo : Tecmedd, 2008.

Brait, M., Dellamano, M., Castro, R. M. Inflamação e câncer In: *Oncologia para a Graduação.* 2 ed. São Paulo: Tecmedd, 2008.

Brait, M., Dellamano, M. Alterações cromossômicas do câncer In: Oncologia para a Graduação, 2005, v.1, p. 47-53.

Brait, M., Dellamano, M. Carcinogênese química e radiação In: Oncologia para a Graduação.1, 2005, v.1, p. 84-91.

Brait, M., Dellamano, M, CASTRO, R. M. Inflamação e Câncer In: Oncologia para a Graduação.1, 2005, v.1, p. 111-118.

II- DEDICATÓRIA

Dedico especialmente ao meu pai Nelson Dellamano e minha mãe Evair Maria Dellamano por sempre acreditarem nos meus sonhos e por todo esforço pra realizá-los, pela ajuda incondicional, pela paciência durante esse período, pela ajuda e amor sem limites e principalmente pelo exemplo de perseverança e honestidade.

Dedico também as minhas queridas irmãs Maria José e Lidiane Dellamano pela fé depositada em mim, pela paciência, pelo exemplo de lealdade e por todos os esforços para que esse trabalho fosse realizado.

Dedico ainda, aos meus amados sobrinhos: Pedro e Guilherme por sempre alegrarem a minha vida e me ensinarem o verdadeiro sentido da palavra felicidade. Sorte a minha ter uma família como essa!

III- AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Flávio Henrique Silva por ter me aceitado como sua aluna em seu laboratório, por tudo que me ensinou durante esses quatro anos, pela competência, pela amizade, pela paciência e pela confiança em mim e no meu trabalho.

Agradeço ao meu segundo orientador Dr. Richard Charles Garratt, por ter aparecido em uma boa hora e ter dado uma contribuição muito importante em meu processo de aprendizado, por todas sugestões, pelas respostas rápidas e também por ter me confiado orientação durante esse período.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos concedida, a FAPESP pelo apoio financeiro através do centro de biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME-CEPID), e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos pelo suporte, auxílio e pela oportunidade de desenvolver o nosso projeto.

Agradeço a todos do departamento de Genética e Evolução.

Agradeço a Dra Adriana Karaoglanovic Carmona (UNIFESP) e ao pós graduando Dr Marcio Fernando Madureira Alves pela imensa contribuição nas análises enzimáticas. Por sempre manterem abertas as portas do laboratório, pela colaboração, pelos valiosos ensinamentos e pela atenção e gentileza com que sempre nos receberam.

Agradeço ao Dr. Napoleão Valadares do Instituto de Física da USP-São Carlos, pela valiosa contribuição para esse trabalho com sua competente análise estrutural, pela paciência, pelas explicações sem fim e por não poupar esforços em me ajudar.

Agradeço ao Prof. Dr. César Rosa do USP-Ribeirão Preto pela realização dos experimentos de espectrometria de massa, os quais foram de grande importância para esse trabalho.

Agradeço a minha querida companheira de laboratório Andréa Soares Costa, por me acompanhar dentro e fora do laboratório. Pelas horas de ensinamentos e explicações, pela paciência nos momentos de desespero, pelas noitadas de experimentos no laboratório, por sempre estar pronta para me ajudar, pelas opiniões compartilhadas, pelo apoio emocional, pelo exemplo de dedicação e generosidade, pela enorme amizade e por tantas outras coisas.

Agradeço também as amigas Rosseli Silveira e Raquel Rinke por todo auxílio científico, técnico e psicológico dentro e fora do laboratório. Pela enorme amizade e cumplicidade.

Agradeço aos colegas do laboratório por todo auxílio, companheirismo e pela boa convivência: Kesser, Ferando, Wilson, Darlan, Daniela e Bianca.

Agradeço aqueles que já passaram por esse laboratório: Andréa Gianotti, Viviane Nogaroto, Kelly da Silva, Simone Michelin, César Sommer, Marina França, que não só deixaram uma enorme saudade, mas pelo divertido e agradável convívio, por tudo que me ensinaram e pelo exemplo de trabalho em equipe. Desejo a vocês toda sorte e felicidade desse mundo!

Agradeço a minha querida amiga Simone Michelin pela confiança e lealdade, por tornar nossos dias mais divertidos com seu bom humor, por estar sempre pronta para ajudar dentro e fora do laboratório, pelo suporte psicológico na etapa final, pelas palavras “salvadoras” e por ter se tornado uma verdadeira irmã.

Agradeço as minhas amigas “super cientistas”: Fabiana Bettoni não só pela enorme amizade e carinho, mas por todo apoio em todas as fases dessa minha caminhada, por estar sempre disposta em me ajudar, pelas sugestões tão sinceras e pela amizade eterna; À Mariana Brait pelo exemplo de força e competência e mesmo que, lá do outro lado do oceano esteve sempre disposta em ajudar, em me ouvir, por poder sempre me ensinar alguma coisa e pela gigante amizade; À Luciana Carla Peters, minha eterna irmã! Quem me encorajou e entrou comigo nessa caminhada. Por uma amizade formada desde o primeiro dia de faculdade que nem o tempo e a distância conseguiram apagar. Por sempre estar presente na minha vida e ser a torcida número um!

Agradeço a minha querida amiga Sylvia Scrocco pelo companheirismo, por ter dividido sua casa, pela amizade, pela paciência, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e também nos mais engraçados. Agradeço por todos os ensinamentos, pelos treinos intermináveis de yoga, pelo exemplo de força, determinação e coragem e pelo laço tão firme que foi formado. Aproveito e agradeço também aos outros companheiros de república: Thiago Nóbrega e Roberto Urioste por sempre estarem dispostos a ajudar, pelas gargalhadas incansáveis, pelas histórias divididas e exemplo de respeito e amizade. Agradeço as duas principais componentes da república: Belle e sua “firole” por tudo que aprontaram, pela demonstração de carinho e desapertarem sempre um sorriso depois de um dia cansado. Todos nós juntos tornamos a casa azul da esquina o ambiente mais agradável e divertido para que pudéssemos levar a vida. Sentirei uma falta enorme de todos vocês!

Agradeço a Ana Paula da Silva Loffredo por toda força e amizade, pelas conversas na praça, pela confiança e companheirismo.

Agradeço as minhas queridas amigas Erica Voltani e Graziela Ghiselli pelo apoio em todas as horas, pelas risadas incansáveis dos finais de semana fora do laboratório, pela confiança, por me ajudarem a manter a sanidade mental.

Agradeço a minha irmã Maria José Dellamano e ao seu marido Alexandre de Oliveira por me hospedarem no período inicial desse estudo, por estarem sempre prontos para ajudar e pelo apoio de sempre.

Agradeço a minha tia Maria, ao tio “Belo” e toda a sua família por sempre me colocarem em suas orações, por acreditarem em meus sonhos, pela torcida organizada, pela demonstração de carinho e força a cada passo meu.

Agradeço a Rodrigo Dellamano por sempre estar ao meu lado, por acreditar em mim, pelo amor de irmão, por me ouvir e me dar conselhos tão sensatos e valiosos, pelo exemplo de um profissional tão competente e generoso, pela força em lutar por seus sonhos e me dar forças para que eu lute pelos meus.

À Prof Dra. Ana Tereza Vasconcelos do LNCC de Petrópolis e todos os membros de seu grupo pela oportunidade de um novo trabalho, em uma nova etapa, que em curto período de tempo me demonstrou confiança, amizade e por entender essa fase um pouco conturbada.

Agradeço a Banca Julgadora da Tese por ter aceitado meu convite e principalmente pelo curto tempo atribuído à leitura dessa Tese.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

IV- APRESENTAÇÃO

As peptidases são enzimas que catalisam a reação da hidrólise das ligações peptídicas em outras proteínas. São enzimas ubíquas e podem ser encontradas em plantas, animais ou microorganismos. Representam uma classe de enzimas envolvidas em diversos processos fisiológicos e bioquímicos. As cisteíno peptidases, uma classe particular das peptidases, são encontradas em praticamente todos os organismos desde os mais simples como os procariotos e vírus, até plantas e mamíferos. Elas estão envolvidas em numerosos processos patológicos devido à atividade enzimática desregulada, como em algumas desordens neurológicas, como o Alzheimer, em processos de metástases, inflamações, arterioesclerose, artrites, doenças do sistema imunológico e em uma variedade de parasitoses infecciosas. As cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno peptidases e seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva através do bloqueio da atividade proteolítica. Sua função principal é garantir a proteção das células e tecidos contra a atividade proteolítica das peptidases lisossomais que podem ser liberadas ocasionalmente no processo natural de morte celular causada por doenças ou invasão de organismos, como insetos. As cistatinas de plantas, também conhecidas como fitocistatinas, são caracterizadas pela ausência de interações dissulfeto e sítios de glicosilação, e formam um ramo importante dentro da árvore evolutiva da superfamília das cistinas. Em plantas, essas cistatinas têm a função de regular a atividade de endógena de enzimas proteolíticas, estão envolvidas no processo de defesa contra insetos e patógenos e também na maturação das sementes. Em estudos recentes em nosso laboratório foram caracterizadas quatro cistatinas da cana-de-açúcar. Esses estudos destacaram a importância dessas cistatinas contra o ataque de patógenos na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), uma planta de cultura expressiva no Brasil, principalmente, devido às suas implicações econômicas como

combustível renovável. Além da potencial inibição da catepsina humana B, uma peptidase envolvida em diversas doenças como o câncer, doença de Alzheimer e artrite.

O trabalho aqui apresentado se refere aos estudos de inibidores de cisteíno peptidases e a identificação e caracterização de uma cisteíno peptidase do trato digestivo da larva do inseto *Sphenophorus levis*, uma importante praga da cana de açúcar. Para tanto, este trabalho foi dividido em duas partes: *Capítulo I*: que se refere ao estudo dos mecanismos moleculares responsáveis pela atividade inibitória de fitocistatinas produzidas por evolução direta de proteínas contra a catepsina B humana; e o *Capítulo II*, que corresponde a caracterização de uma cisteíno peptidase presente no trato intestinal de larvas *S. levis*.

V-LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I:

Figura 1:	Nomenclatura de Schechter & Berger (1967)	8
Figura 2:	Estrutura tridimensional da papaína	11
Figura 3:	Mecanismo catalítico das cisteíno-peptidases	12
Figura 4:	Visão esquemática da interação entre a cistatina C humana e uma cisteíno peptidase do tipo papaína	16
Figura 5:	“DNA shuffling”	19
Figura 6:	Modelagem molecular de proteínas por homologia	23
Figura 7:	Representação esquemática do funcionamento do Kit “Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis System” (Invitrogen)	32
Figura 8:	Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das proteínas CaneCPI-1(canacis), OC-I, e A10PL3	38
Figura 9:	Alinhamento representativo entre as fases abertas de leitura das cistatinas mutantes A10PL3, Mutantes I, II e III	40
Figura 10:	Expressão heteróloga e purificação das cistatinas	43
Figura 11:	Inibição da atividade da catepsina L humana pelas cistatinas recombinantes	45
Figura 12:	Inibição da atividade da catepsina B humana pelas cistatinas recombinantes	46
Figura 13:	Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das cistatinas	49
Figura 14:	Estrutura tridimensional da Orizacistaina -1	51
Figura 15:	Modelo da estrutura tridimensional da Canacistatina -1	54

CAPÍTULO II

Figura 1:	<i>Sphenophorus Levis</i>	83
Figura 2:	Danos causados pelo ataque do <i>Sphenophorus levis</i>	84
Figura 3:	Visão geral do trato digestivo e excretório insetos	88
Figura 4:	Purificação de uma cisteíno peptidase do trato digestivo de <i>Sphenophorus Levis</i>	101
Figura 5:	Espectro resultante da análise de ESI-CID-MS/MS dos peptídeos trípticos da enzima de <i>Sphenophorus Levis</i>	103
Figura 6:	Espectro ESI-CID-MS/MS dos peptídeos resultantes da digestão da enzima isolada de <i>Sphenophorus Levis</i> com tripsina	104
Figura 7:	Influência do pH e NaCl na hidrólise do substrato Z-FR-MCA pela cisteíno peptidase de <i>Sphenophorus Levis</i>	107
Figura 8:	Inibição da atividade da cisteíno peptidase isolada de <i>Sphenophorus levis</i> pelas cistatinas recombinantes e pelo inibidor sintético E64.	109

VI- LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I:

Tabela 1:	Constantes de Inibição (K_i app) calculadas para cada uma das cistatinas recombinantes contra as catepsinas humanas B e L	44
------------------	--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1:	Seqüência dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos trípticos da proteína de <i>Sphenophorus levis</i> obtida por ESI-CID-MS/MS	102
Tabela 2:	Constantes de segunda ordem (K_{cat}/K_m) para a hidrólise de substratos fluorogênicos pela cisteíno peptidase de <i>Sphenophorus levis</i>	106
Tabela 3:	Inibição de atividade da cisteíno peptidase de <i>Sphenophorus levis</i> por diferentes inibidores de cisteíno peptidases.	108

VII- LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
μM :	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	graus Célcus
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
Aa	Aminoácidos
Abs	Absorbância
BSA	albumina do soro bovino
BBI	“bowman birk inhibitor”
A10PL3	Inibidor de cisteíno-peptidase da cana-de-açúcar A10PL3
CA074	N-(L-3-trans-propylcarbamoxyloxirane-2-carbonil)-L-isoleucyl pro-L-line]
CaneCPI-1	Inibidor de cisteíno-peptidase da cana-de-açúcar 1
CaneCPI-2	Inibidor de cisteíno-peptidase da cana-de-açúcar 2
CaneCPI-3	Inibidor de cisteíno-peptidase da cana-de-açúcar 3
CaneCPI-4	Inibidor de cisteíno-peptidase da cana-de-açúcar 4
cDNA	DNA complementar
CID	dissociação induzida por colisão
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DO	densidade óptica
DTT	Ditioeritritol
EDTA	ácido etileno diamino tetra
ESI	ionização em fase líquida por “eltrospray”
E64	transepoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano
EST	“expressed sequence tag”
G	Gramas
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons
Ki	constante de inibição
K_i app	constante de inibição aparente
M	Molar
MS	espectrometria de massa
mA	Miliampéres
Mg	Miligrama
mim	Minuto
mL	Mililitro
NCBI	“national center of biotechnology information”
Ni-NTA	níquel ácido nitrilacético
Ng	Nanograma
Nm	Nanomolar
NT	Nucleotídeo
OC-1	Inibidor de cisteíno-peptidase do arroz (orizacistatina 1)
ORF	“Open reading frame” (fase aberta de leitura)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase)
Pb	pares de base

PDB	“Protein data Bank”.
pH	potencial de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
S	Segundo
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato
U	Unidade enzimática
uV	Ultravioleta
V	Volts
Vs	Versus
X	Vezes
Z-RR-MCA	carbобензохисarbonil-Arg-Arg-7-amino-4-metilcoumarina
Z-FR-MCA	carbобензохисarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina
Z-LR-MCA	carbобензохисarbonil-Leu-Arg-7-amino-4-metilcoumarina
k_{cat}	Número de moléculas de substrato atingidas por um sítio ativo da enzima por segundo
K_m	constante de Michaelis-Menten (quantidade de substrato necessária para a enzima atingir metade da velocidade máxima)

Aminoácidos

Nome	1 letra	3 letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Asn + Asp	B	Asx
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido Glutâmico	E	Glu
Gln + Glu	Z	Glx
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

SUMÁRIO

SÚMULA

CURRICULAR.....I

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
APRESENTAÇÃO.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VII
<u>CAPÍTULO I</u>.....	1
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. Enzimas proteolíticas.....	5
1.2. Cisteíno peptidases.....	8
1.3. Cistatínas.....	13
1.4. Evolução molecular direta de proteínas.....	18
1.5. Modelagem molecular de proteínas.....	20
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivos gerais.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Análise da fase aberta de leitura do clone A10PL3.....	27
3.2. Expressão e purificação das proteínas CaneCPI-1, OC-1 e A10PL3.....	27
3.2.1. Expressão recombinante em <i>E.coli</i>	27
3.2.2. Purificação das proteínas.....	29

3.3. Construção das cistatinas mutantes pelo método de mutação sítio-dirigida.....	30
3.3.1. Expressão e purificação das proteínas mutantes I, II e III.....	35
3.4. Ensaio de inibição de atividade enzimática das catepsinas humanas B e L.....	35
3.5. Modelagem molecular.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Análise da fase aberta de leitura do clone A10PL3.....	38
4.2. Construção dos Mutantes I, II e III.....	39
4.3. Análises de expressão e purificação das cistatinas: CaneCPI-1, OC-1, A10PL3, Mutantes I, II e III.....	41
4.4. Ensaio de inibição de atividade das catepsinas humanas B e L.....	44
4.5. Modelagem molecular de proteínas por homologia.....	49
5. CONCLUSÕES.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

<u>CAPÍTULO II</u>	75
RESUMO	77
ABSTRACT	78
1. INTRODUÇÃO	79
1.1. A cana-de-açúcar e sua importância para a economia do Brasil.....	79
1.2. Pragas da cana-de-açúcar.....	81
1.3. Peptidases digestivas de insetos.....	87
1.4. Cisteíno peptidases em insetos.....	89
2.	
OBJETIVOS	94
2.1. Objetivos gerais.....	94
2.2. Objetivos específicos.....	94
3. MATERIAIS E MÉTODOS	95
3.1. Purificação de uma cisteíno peptidase do trato digestivo de <i>Sphenophorus levis</i>	95
3.1.1. Obtenção das larvas de <i>Sphenophorus levis</i>	95
3.1.2. Extração e purificação da cisteíno peptidase das larvas de <i>Sphenophorus levis</i> ...95	
3.2. Digestão com tripsina da cisteíno peptidase e análise por espectrometria de massa	96
3.3. Ensaio de atividade enzimática da cisteíno peptidase purificada de <i>Sphenophorus levis</i>	97
3.4. Atividade da cisteíno peptidase de <i>Sphenophorus levis</i> em diferentes condições de pH e concentrações de NaCl.....	98
3.5. Inibição da atividade enzimática da cisteíno peptidase de <i>Sphenophorus levis</i>	98

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
4.1. Purificação de uma cisteíno peptidase do trato digestivo do <i>Sphenophorus levis</i> ..	100
4.2. Análises da espectrometria de massa.....	101
4.3. Especificidades de substrato e estudos cinéticos da cisteíno peptidase purificada de <i>Sphenophorus levis</i>	104
4.4. Perfil de atividade em diferentes condições de pH e NaCl.....	106
4.5. Ensaio de atividade inibitória da cisteíno peptidase de <i>Sphenophorus levis</i>	107
5. CONCLUSÕES.....	115
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

Capítulo I

**Estudos dos mecanismos moleculares
responsáveis pela atividade inibitória de
fitocistatinas produzidas por evolução
direta de proteínas contra catepsina B
humana**

RESUMO

Cistatinas são proteínas que inibem especificamente cisteíno peptidases. A canacistatina 1, uma proteína com 106 resíduos de aminoácidos, apresenta grande similaridade com a proteína Orizacistatina 1, uma cistatina de arroz. Com o objetivo de se obter uma cistatina com a atividade inibitória melhorada, experimentos de evolução molecular direta de proteínas foram realizados, através da construção de uma biblioteca de “DNA shuffling” usando estas duas cistatinas. Um clone denominado A10PL3 foi selecionado, expresso, purificado e submetido a ensaios de inibição de atividade enzimática. Foi demonstrado que a proteína A10PL3 exibiu aumento da atividade inibitória contra catepsina B humana em comparação com seus dois precursores. O presente estudo teve como objetivo reverter as alterações do clone A10PL3 através de mutações sítio-dirigidas, gerando mais três cistatinas mutantes: Mutante I (Thr17Ile), Mutante II (Gln 84 Leu) e Mutante III (Thr17Ile); (Gln84Leu). Ensaios de atividade inibitória dos mutantes contra as catepsinas humanas B e L foram realizados. Além disso, foram desenvolvidos estudos estruturais por meio de modelagem molecular de proteínas por homologia que permitiram a compreensão dos determinantes moleculares relacionados à melhoria da atividade inibitória destas cistatinas. Os resultados aqui apresentados são importantes, pois corroboram com os dados observados anteriormente, demonstrando a melhora na especificidade da atividade inibitória da proteína A10PL3 contra a catepsina B ($K_i = 16 \text{ nM}$) em relação aos seus parentais. Os mutantes I, II e III não foram capazes de inibir a catepsina B. Os estudos estruturais revelaram que as mutações na cistatina A10PL3 desestabilizaram o núcleo hidrofóbico provavelmente tornando a região N-terminal da proteína mais flexível, influenciando a atividade inibitória contra a catepsina B. A desestabilização do núcleo hidrofóbico resultou na tendência de uma menor solubilidade, provavelmente devido à sua tendência de expor resíduos que fazem parte desse núcleo, o que pode levar à agregação e também contribuir para o aumento da flexibilidade da cistatina.

ABSTRACT

Cystatins are proteins that inhibit specifically cysteine peptidases. The Canecystatin 1 gene which codifies a protein containing 106 amino acids residues was identified in sugarcane and possesses significant similarity with Oryzacystatin, a cystatin from rice. In order to obtain a cystatin with improved activity, direct evolution experiments were carried out. A DNA shuffling library was constructed using these two cystatins. One clone named A10PL3 obtained from these shuffled cystatins was selected, expressed in *E.coli*, purified and analyzed by activity assays. These results showed that the activity of hybrid protein A10PL3 increased, in particular regarding its inhibitory activity on cathepsin B compared with its two precursors. The present study aimed to revert the changes of individual clone A10PL3 through site-directed mutations, generating three mutant cystatins: Mutant I (Thr17Ile), Mutant II (Gln84Leu) and Mutant III (Thr17Ile); (Gln84Leu). Assays for inhibitory activity against the human cathepsins B and L were performed. Structural studies were also made by means of molecular modeling of proteins by homology that were enabled to understand the molecular mechanisms related to improvement of the inhibitory activity of these cystatins. These studies therefore corroborate with the observed data previously which demonstrated the improvement of specific protein A10PL3 in cathepsin B inhibition (K_i 16 nM) in relation to their parents. The mutants I, II and III, did not present improvement in inhibitory activity against cathepsin B. The structural studies revealed that the mutations performed on cystatin A10PL3 destabilized the hydrophobic core making it more flexible, thus increasing the inhibitory activity on cathepsin B. The absence of interactions underlying the hydrophobic core resulted in a trend of lower solubility, probably due to their inability to adopt a compact formation, which resulted in the exposure of some residues which are part of that core, which can lead to aggregation and also contribute to increasing the flexibility of cystatin, influencing their inhibitory activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas, também conhecidas como peptidases, são proteínas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas (Barrett *et al*, 2004). São enzimas da classe das hidrolases e da subclasse das peptídeo-hidrolases ou peptidases, as quais representam uma classe de enzimas envolvidas em diversos processos fisiológicos e bioquímicos (Antonov, 1993; Beyon & Bond, 2001). As peptidases podem ser encontradas em plantas, animais sendo que, os microorganismos proteolíticos parecem ser as mais promissoras fontes de peptidases por produzirem uma maior variedade de enzimas específicas em comparação às plantas ou aos animais (Dinis & Martin, 1999). São enzimas que desempenham diversas funções essenciais para todos os organismos e compreendem aproximadamente 2% do produto gênico total distribuído em compartimentos celulares e teciduais (Barrett, 1987; Sajid & Mackerrow, 2002).

As peptidases apresentam ampla aplicação comercial, estão entre os três maiores grupos de enzimas produzidas em escala industrial e são responsáveis por 30% do total de enzimas produzidas no mundo (Singh *et al*, 2001). Possuem diversas aplicações biotecnológicas, como na produção de alimentos, detergentes, couro, hidrolisados protéicos e fármacos (Al Shehri *et al*, 2004) e estão envolvidas em diversos processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos (Gofrey & West, 1996). Além disso, participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, e na liberação de hormônios e peptídeos farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras (Rao *et al*, 1998).

Embora as peptidases sejam fundamentais para o metabolismo celular, elas também estão envolvidas em processos patológicos devido à atividade enzimática

desregulada, como em algumas desordens neurológicas, como o Alzheimer, em processos de metástases, inflamações, arteriosclerose, artrites, doenças do sistema imunológico e em uma variedade de parasitoses infecciosas (Hooper, 2002; Lecaille *et al*, 2002; Rzychon, *et al*, 2004).

Estas enzimas constituem uma grande família, que pode ser subdividida em endopeptidases ou exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada. As endopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas internas à cadeia polipeptídica, já as exopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas próximas às extremidades C-terminal ou N-terminal. Aquelas que clivam o esqueleto peptídico próximo a região N-terminal podem liberar um, dois ou três peptídeos (aminopeptidases, dipeptidil peptidases, tripeptidil peptidases, respectivamente). As exopeptidases que atuam na região C-terminal podem liberar um único resíduo (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases) (Barrett, 1994).

As peptidases podem ainda ser subdivididas de acordo com o resíduo de aminoácido essencial ao sítio ativo, que são responsáveis pelo mecanismo catalítico. Dessa forma, as peptidases são agrupadas em seis classes principais: serino-peptidases, cisteíno-peptidases, aspartil-peptidases, treonino-peptidases, glutamil-peptidases e metalo-proteinases (Rawlings *et al*, 2008).

As serino-proteases são caracterizadas pela presença de um grupo serino em seu sítio ativo (Beynon & Bond, 2001) e compreendem em duas famílias distintas. A família quimiotripsina, as quais incluem as enzimas de mamíferos, quimiotripsina, calicreína e elastase, e a família subtilisina em que são encontradas enzimas bacterianas como a subtilisina. Em geral, a estrutura tridimensional das duas famílias é diferente, porém a geometria do sítio catalítico e o mecanismo de catálise são os mesmos, três resíduos de aminoácidos formam a tríade catalítica (serina, histidina e ácido aspártico),

sendo que todas estas peptidases exibem atividade catalítica na faixa de pH de 7,0 a 10,0 (Beynon & Bond, 2001; Barrett *et al*, 2004).

As cisteíno peptidases são enzimas proteolíticas que possuem resíduos de cisteína ou histidina em seu sítio catalítico (Rzychon *et al*, 2004). Possuem massa molecular entre 21-30 kDa e exibem alta atividade hidrolítica na faixa de pH entre 4 - 6,5. Dentro dessa classe se incluem as peptidases de plantas, como papaína, catepsinas lisossomais de mamíferos, como catepsina L e B, calpaínas e peptidases de parasitas.

Já as metalo-peptidases são enzimas nas quais a atividade é dependente da ligação de um metal, geralmente zinco, em seu sítio catalítico sendo que, a substituição do zinco por cobalto ou níquel não resultam na perda da atividade catalítica. Estudos cristalográficos indicam que o zinco é ligado por duas histidinas e um ácido glutâmico. Essas enzimas variam quanto à filogenia (de bactérias a mamíferos) e funções “in vivo” (Blundell, 1994).

Grande parte das aspartil-peptidases pertence à família pepsina, incluindo enzimas digestivas (como a pepsina e quimosina), catepsinas lisossomais (como catepsina D), enzimas de processamento e algumas peptidases de fungos (como a penicilopepsina). Estas enzimas são compostas por moléculas bilobadas sendo que cada lobo possui um resíduo de ácido aspártico formando a díade catalítica no sítio ativo localizado entre os dois lobos. Além disso, há uma segunda família em que pertencem as peptidases virais, como a peptidase do vírus HIV, a qual é denominada retrotripsina.

As treonino e glutamil peptidases são enzimas relativamente novas e ainda pouco estudadas. Sabe-se que as treonino-peptidases dependem de um resíduo do aminoácido treonina em seu sítio ativo para a atividade enzimática. Os membros desta classe de enzimas constituem as subunidades catalíticas do proteossomo, envolvido no

processo de “turnover” intracelular de proteínas. Estas peptidases são encontradas em vírus, bactérias, fungos, plantas e animais (Barrett *et al*, 2004; Rawlings *et al*, 2008).

Schechter & Berger (1967) desenvolveram um sistema de nomenclatura para a descrição da especificidade de todas as peptidases. De acordo com esse estudo, os subsítios da enzima, designados pela letra “S”, flanqueiam o sítio catalítico da enzima e são locais de ligação da enzima ao substrato. Cada subsítio é capaz de acomodar um único resíduo de aminoácido do substrato. Eles são enumerados a partir do ponto de clivagem e são denominados de $S_1, S_2 \dots S_n$ em direção à região N-terminal da enzima, e $S_1', S_2' \dots, S_n'$, em direção à região C-terminal da enzima. Os resíduos de aminoácidos dos peptídeos que os subsítios acomodam são designados pela letra “P”. Similarmente, $\dots P_3, P_2, P_1, P_1', P_2', P_3' \dots$ são utilizados para designar os subsítios dos resíduos que se acomodam aos resíduos da protease correspondentes. (Figura 1).

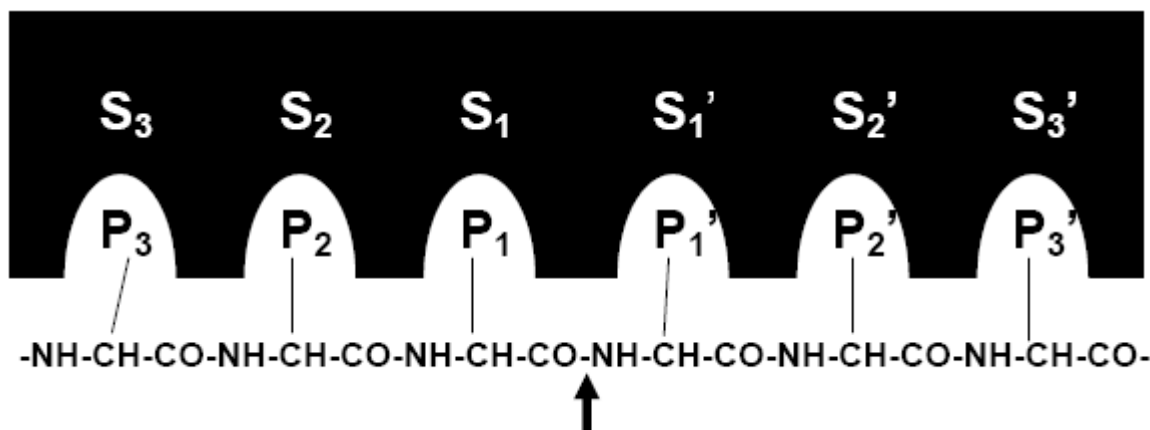


Figura 1: Nomenclatura de Schechter & Berger (1967). Nomenclatura de Schechter & Berger para descrever a interação do substrato peptídico com uma peptidase. A peptidase está representada pela área escura. $P_1 \dots P_1'$ são cadeias laterais dos seus resíduos de aminoácidos apresentados e $S_1 \dots S_1'$ são os subsítios com os quais os peptídeos interagem. A seta indica o local da hidrólise.

1.2. Cisteíno peptidases

As cisteíno-peptidases fazem parte de um complexo grupo de enzimas, apresentam diversas propriedades físicas e bioquímicas e estão amplamente presentes entre as espécies, sendo distribuídas entre 72 famílias (Rawlings & Barrett, 2008). Em

vertebrados, as cisteíno-peptidases estão envolvidas no processo de degradação de proteínas lisossomais, além de participarem de processos extracelulares como em algumas desordens metabólicas. Em invertebrados, como nematóides e ácaros, as cisteíno-peptidases estão entre as enzimas digestivas e em artrópodos, como lagostas, elas exercem um papel digestivo e também estão relacionadas a processos no sistema nervoso (Rawlings & Barrett, 1994). Em insetos elas são principalmente utilizadas em processos digestivos (Rawlings & Barrett, 1994). As cisteíno peptidases também são muito utilizadas por vírus, fungos e bactérias para a infecção de plantas (Bode & Huber, 2000).

As cisteíno peptidases pertencentes à família C1 do clã CA, as quais correspondem à família da papaína (por ter sido extraída do látex da *Carica papaya*) correspondem às mais extensivamente caracterizadas até os dias atuais (Turk *et al*, 2008). A papaína foi a primeira enzima da família a ter sua estrutura tridimensional determinada por estudos de cristalografia de raios X (Drenth *et al*, 1968). As enzimas que apresentam características semelhantes a esta família são descritas como do tipo papaína ou do inglês “papain like”. Sendo que, o maior volume de informações disponíveis de cisteíno-peptidases tem sido obtido a partir de estudos com membros da família papaína e, conseqüentemente, estas enzimas são consideradas como arquétipos das cisteíno-peptidases (Ménard, 1993; Rawlings *et al*, 2008).

Diversas cisteíno-peptidases já foram descritas em tecidos de mamíferos. Entre os membros dessa classe se incluem as catepsinas lisossomais: catepsinas B, C, H, K, L, M, N, S, T, V e W e as calpaínas citosólicas: calpaína do tipo I e III que são enzimas dependentes de cálcio, encontradas no citoplasma (Otto & Schirmeister, 1997; McGrath, 1999).

Sob condições normais, as cisteíno-peptidases de mamíferos estão envolvidas em uma série de processos biológicos, tais como diferenciação celular, agregação de plaquetas, invasão celular, processamento pós ribossomal de proteínas, “turnover” de proteínas, entre outros. Entretanto, em circunstâncias em que elas se tornam desreguladas, encontram-se envolvidas em diversas doenças, como distrofia muscular, esclerose múltipla, infecções bacterianas, infarto do miocárdio, reabsorção óssea, tumores e artrite (Mérnard, 1993). As cisteíno peptidases também ocorrem como elementos essenciais no ciclo de vida de diversos protozoários e helmintos como *Trypanosoma cruzi* (doença de chagas), *Leishmania mexicana* (leishmaniose), *Schistosoma mansoni* (esquistossomose), *Plasmodium falciparum* (malária), *Entamoeba histolytica* (desintéria) (North, *et al*, 1990).

As cisteíno-peptidases exibem função de extrema importância no metabolismo protéico celular, por meio de processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, na degradação de proteínas de matriz extracelular. Estão também envolvidas em diversos processos patológicos, tais como Alzheimer, osteoporose (Otto & Schimeister, 1997; Abrahamson, 1993.) e câncer (Cordes *et al*, 2009; Devetzi *et al*, 2009). Além do processamento das proteínas, sabe-se que as cisteíno-peptidases desempenham várias funções importantes em microrganismos, como no processo de imuno-invasão, ativação de enzimas, encistamento e invasão de células e tecidos (Sajdi & McKerrow, 2002).

Uma característica comum a todas as cisteíno-peptidases com estrutura tridimensional conhecida é a ocorrência de uma estrutura bilobada com o sítio catalítico localizado na reentrância entre os lobos, denominados de domínios L (do inglês: *left (L)-domain*) e R (do inglês: *right (R)-domain*) (Figura 2). Os aminoácidos cisteína e histidina são essenciais para a atividade catalítica desta peptidase, com a cisteína localizando-se no domínio L e a histidina no domínio R oposto (McGrath, 1999).

Geralmente, esta estrutura é estabilizada por três interações dissulfeto sendo que, duas estão no domínio L e uma no domínio R. A presença de um resíduo de glutamina altamente conservado também é muito importante para a atividade proteolítica da enzima, já que ela é responsável por estabilizar a estrutura tetraédrica intermediária durante a hidrólise do substrato (Rawlings & Barret, 2000). Os substratos polipeptídicos ligam-se ao longo da reentrância dos lobos em uma conformação estendida.

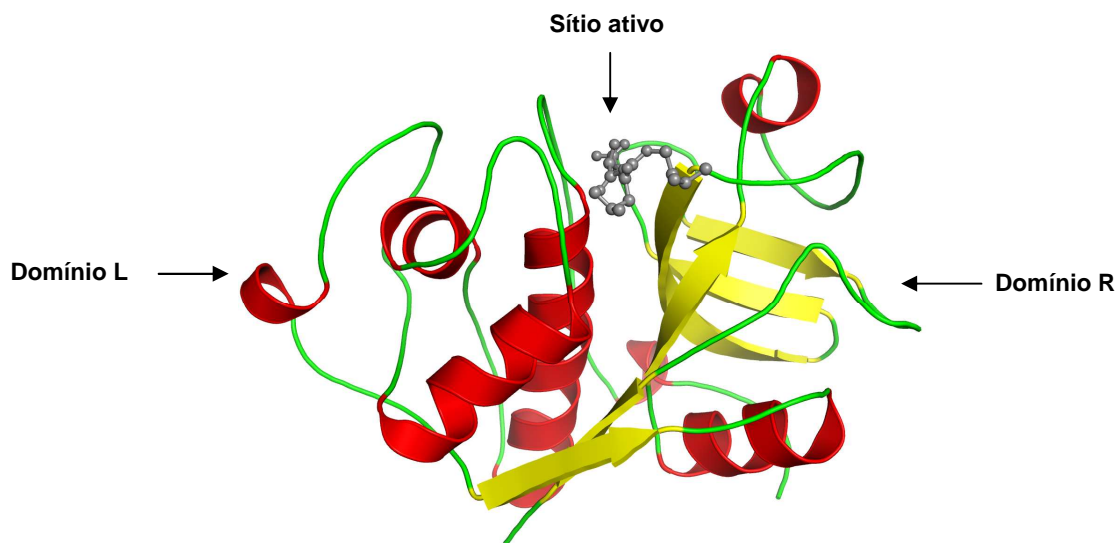


Figura 2: Estrutura tridimensional da papaína. A figura ilustra a estrutura tridimensional da papaína em que estão representados os dois domínios (L e R) separados pela fenda do sítio ativo. O domínio N-terminal compreende principalmente de três hélices do tipo α e o domínio C-terminal apresenta uma estrutura em barril- β . Em cinza o inibidor de cisteína peptidase E64. Modificado de Rawlings *et al*, 2008.

Um grupamento tiol de um resíduo de cisteína participa do mecanismo de catálise destas enzimas, agindo como um grupo nucleófilo na hidrólise da ligação peptídica. Além disso, uma base acceptora de prótons, o anel imidazólico de um resíduo de histidina, também participa do processo catalítico (Rawlings & Barrett, 1995). O mecanismo de catálise das cisteíno-peptidases é caracterizado pela formação de um intermediário covalente, a acil-enzima, resultante do ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína presente no sítio ativo sobre a carbonila da ligação peptídica que será hidrolisada. O grupo imidazol da cadeia lateral da histidina atua como acceptor de

hidrogênio na catálise e um resíduo de asparagina participa orientando o anel imidazólico da histidina (Beyon & Bond, 1989; Storer & Mérnard, 1994; Barrett *et al*, 2004). A figura 3 representa o mecanismo de catálise das cisteíno-peptidases, o qual usualmente segue uma reação de dois passos. O passo inicial envolve a ligação não covalente da enzima livre (estrutura A) e o substrato peptídico para formar um complexo (estrutura B). Posteriormente ocorre a acilação da enzima (estrutura C) com a formação e liberação do primeiro produto, a amina $R'-NH_2$. No próximo passo de deacilação, a enzima reage com uma molécula de água para liberar o segundo produto (estrutura D), ocorrendo então à regeneração da enzima livre (Rao *et al*, 1998).

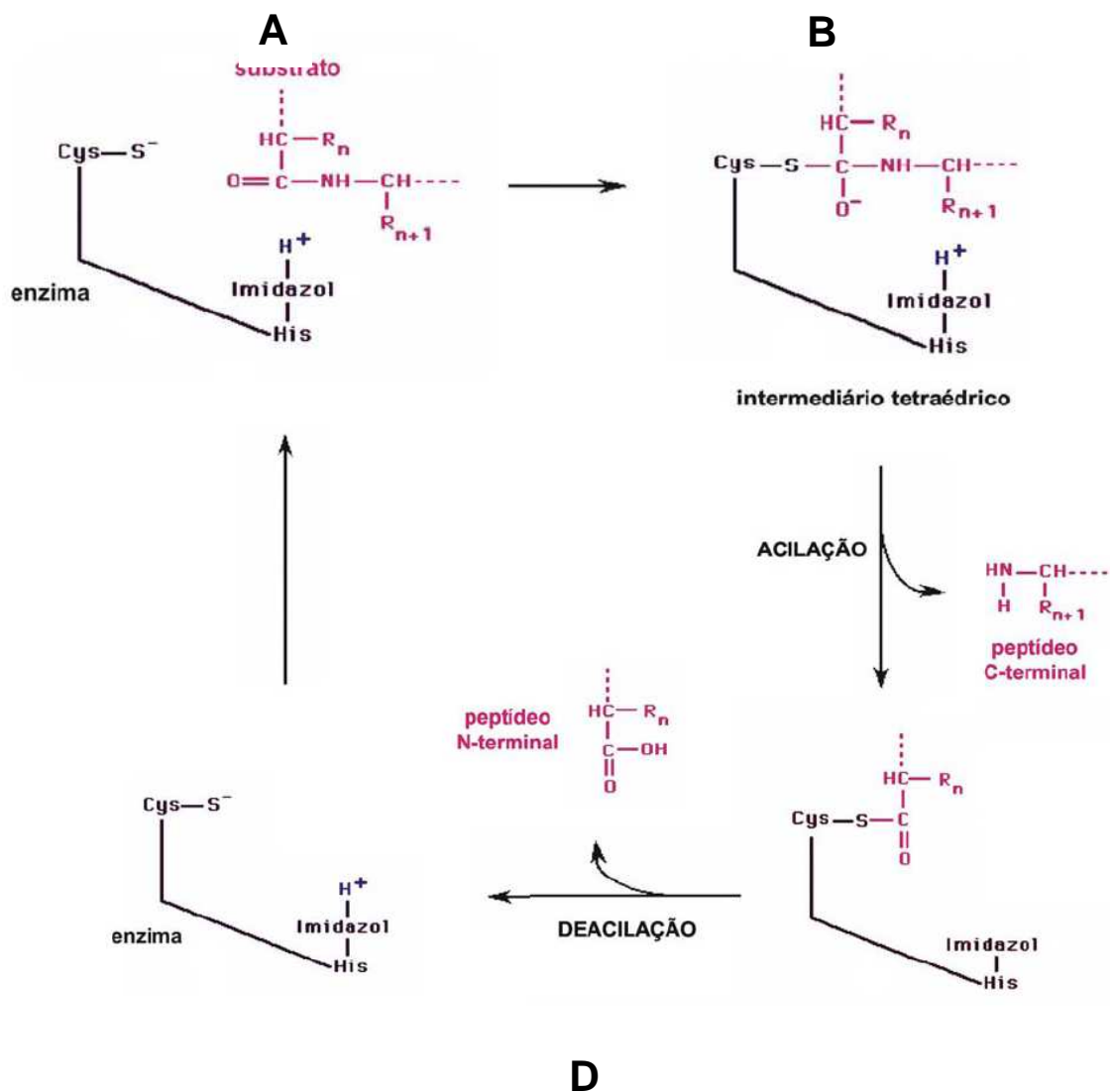


Figura 3: Mecanismo catalítico das cisteíno-peptidases (Adaptado de Rao *et al*, 1998).

1.3. Cistatinas

Os inibidores protéicos naturais de cisteíno-peptidases são chamados de cistatinas. O nome cistatina foi dado originalmente por Barrett (1987) a um inibidor de cisteíno peptidase do tipo papaína isolado da clara do ovo da galinha (“chicken egg white cystatin”). As cistatinas são proteínas com a capacidade de atenuar ou inibir a atividade das peptidases, pois podem agir intra ou extracelularmente formando um complexo com sua enzima alvo com o objetivo de manter o equilíbrio entre a enzima livre e seus complexos e garantir o funcionamento correto dos sistemas biológicos de todos os organismos (Martinez & Dias, 2008). Atuam como inibidores reversíveis de cisteíno-peptidases e seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva por meio do bloqueio da atividade proteolítica (Abrahamson, 1993). Tem como função principal garantir a proteção das células e tecidos contra a atividade proteolítica das peptidases lisossomais que podem ser liberadas ocasionalmente no processo natural de morte celular ou causada por doenças ou invasão de organismos, como insetos (Barrett & Kirschke, 1981).

As cistatinas têm sido consideradas evolutivamente relacionadas formando a “superfamília cistatina” que são capazes de inibir proteinases da classe C1A, pertencentes à subfamília do tipo papaína. De acordo com o grau de homologia, tendo-se como base as similaridades entre as seqüências primárias; as massas moleculares; o número de pontes dissulfeto e a localização subcelular entre as proteínas, os membros da superfamília das cistatinas podem ser agrupados em três famílias (Turk & Bode, 1991; Barrett, 1987).

As cistatinas pertencentes à família 1, ou família das estefinas, são proteínas constituídas de uma única cadeia polipeptídica, de baixo peso molecular (com aproximadamente 11 kDa). Estas proteínas não formam pontes dissulfeto internas,

conservam um “loop” Gln-Val-Val-Ala-Gly em sua região central e estão localizadas, geralmente, no citosol. Os inibidores da família 2, ou somente família cistatina, também são proteínas de baixa massa molecular (com massa de 14 a 24 KDa), possuem cadeia simples, porém formam duas ligações dissulfeto e conservam um “loop” central formado de Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly. As cistatinas pertencentes à família 3, ou cininogênicos, mostram uma organização estrutural mais complexa, pois são compostos de três cadeias polipeptídicas, constituídos por proteínas de alto peso molecular (possuem aproximadamente de 60 a 120 KDa), formam pontes dissulfeto e são glicosiladas. Foram inicialmente isoladas a partir do plasma sanguíneo e apresentam repetições da seqüência Gln-Val-Val-Ala-Gly (Abrahamson, 1993).

Existe ainda uma quarta classe de cistatinas com baixa massa molecular que inclui os inibidores de cisteíno peptidases de plantas, denominadas fitocistatinas (Margis *et al*, 1998). Os membros desta família apresentam características que são comuns às famílias 1 e 2, já que o tamanho e a estrutura primária são semelhantes aos da família das cistatinas, ao passo que se assemelham aos das estefinas pela ausência de pontes dissulfeto e resíduos de cisteína. A massa molecular das fitocistatinas está entre 5 e 87 KDa. Elas possuem uma seqüência consenso L-A-R[FY]-A-[VI]-X(3)-N exclusiva de cistatinas de plantas formando uma hélice alfa na região N-terminal, o que torna possível a sua inclusão em uma família própria (Margis *et al*, 1998). Diversas fitocistatinas apresentam ainda uma extensão na região C-terminal que está envolvida no processo de inibição das cisteíno peptidases pertencentes à família C13, das leguminaínas (Martinez & Diaz, 2008).

A Orizacistatina-1 (OC-1), uma proteína isolada da semente do arroz, foi a primeira cistatina bem definida de origem vegetal. Atua como inibidora de cisteíno peptidase e possui uma ação potencial em enzimas alvos exógenas como de insetos e

fungos (Abe *et al*, 1987). As fitocistatinas têm sido identificadas em uma variedade de plantas superiores como o arroz (Abe *et al*, 1987), milho (Abe *et al*, 1992), soja (Hines *et al*, 1991), cevada (Joshi *et al*, 1998), trigo (Kuroda *et al*, 2001), gergelim (Shyu *et al*, 2004), cana-de-açúcar (Soares-Costa, *et al*, 2002; Gianotti *et al*, 2006), morango (Martinez *et al*. 2005a), eruca marítima (Megdiche *et al*, 2008).

Conforme já mencionado neste capítulo, a cinética de interação entre as cistatinas e suas peptidases-alvo caracteriza-se por uma reação reversível e competitiva. Entretanto, sua afinidade às enzimas alvo é tão alta que se torna difícil demonstrar o caráter reversível da ação desses inibidores ou a competição direta com os substratos (Nicklin & Barrett, 1984).

Diversos modelos de interação entre as cistatinas e as cisteíno-peptidases alvos têm sugerido a existência de três regiões da cistatina envolvidas no processo de reconhecimento, que possuem resíduos ou domínios conservados entre a maioria delas. Esses domínios correspondem a um resíduo de glicina na região N-terminal, um motivo Gln-X-Val-X-Gln altamente conservado na região central formando o primeiro “loop”, e uma região contendo um resíduo de triptofano em um segundo “loop” próximo à extremidade C-terminal (Barrett, 1987; Martinez & Dias, 2008). O mecanismo inibitório das cistatinas tem sido explicado pela presença destes três pontos de contato com a peptidase alvo (Figura 4). Esses três segmentos juntos formam uma estrutura em forma de cunha com boa complementaridade para a fenda do sítio ativo de cisteíno peptidases do tipo papaína, com uma conformação que não permite a clivagem da cadeia polipeptídica da cistatina. Os dois “loops” correspondentes à região central e C-terminal da cistatina exibem tamanhos e formas que se encaixam na região correspondente aos subsítios S₁' e S₂' da fenda do sítio ativo presente na enzima. Já, o segmento correspondente à porção N-terminal que contém o resíduo de glicina

conservado entre as cistatinas, se encaixa no subsítio S₂ do sítio ativo da enzima, entretanto com uma conformação inapropriada para a hidrólise enzimática (Bode *et al*, 1988; Turk & Bode, 1991; Bode & Huber, 1992; Abrahamson, 1993).

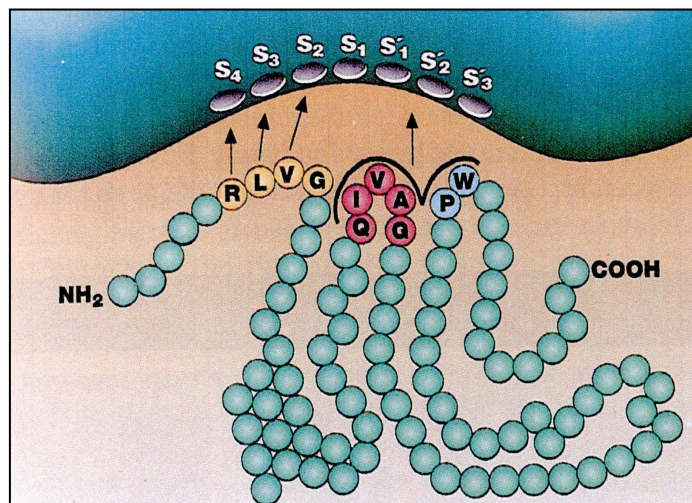


Figura 4: Visão esquemática da interação entre a cistatina C humana e uma cisteíno peptidase do tipo papaína. O sítio ativo da enzima é mostrado na parte superior da figura. A cadeia polipeptídica da cistatina C é ilustrada abaixo com os resíduos de aminoácidos indicados por letras. Três segmentos da cistatina estão envolvidos na ligação da enzima. Os resíduos da região N-terminal (amarelo) interagem com o substrato. Dois “loops” são formados, um em vermelho na região central e um segmento localizado próximo a região C-terminal (azul) juntos formam a área de contato com a peptidase. A conformação da molécula da cistatina não permite que ela seja clivada por uma peptidase na interação (Abrahamsom, 1993).

Os inibidores de serino e cisteíno peptidases são amplamente distribuídos nos tecidos de reserva das plantas. As fitocistatinas possuem dupla função: 1) estão relacionadas com a regulação da atividade de cisteíno peptidases endógenas durante o processo de desenvolvimento e maturação da semente (Arai *et al*, 2002; Corre-Menguy *et al*, 2002; Martinez *et al*, 2005b), e na morte celular programada (Solomon *et al*, 1999; Belenghi *et al*, 2003); 2) na proteção contra o ataque de patógenos por sua habilidade de inibir proteínas exógenas, como aquelas presentes no trato digestivo de insetos e dessa forma, os inibidores de peptidases podem ser considerados agentes anti-metabólitos, pois levam a uma deficiência protéica nos patógenos, a qual é ocasionada pela diminuição da disponibilidade de aminoácidos prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do mesmo (Arai *et al*, 2002;

Corre-Menguy *et al*, 2002; Martinez e Dias, 2008). Além disso, o ganho de resistência é observado também em plantas transgênicas que super expressam os genes das fitocistatinas (Vain *et al*, 1998; Gutierrez-Campos *et al*, 1999; Walker *et al*, 1999; Bouchard *et al*, 2003), além de determinadas atividades antifúngicas já descritas (Siqueira-Junior *et al*, 2002; Soares-Costa *et al*, 2002; Martinez *et al*, 2003).

As cistatinas de cana-de-açúcar foram descritas primeiramente por Margis e colaboradores (2001) que identificaram no banco de dados do projeto genoma SUCEST - FAPESP vinte e cinco prováveis fitocistatinas classificadas em 4 grupos por análises filogenéticas. O grupo I é formado por cistatinas com organização estrutural típica, além das três regiões conservadas na superfamília das cistatinas, apresenta uma seqüência consenso na região N-terminal característica de fitocistatinas. No grupo II se encontram cistatinas com as mesmas características do grupo I, entretanto estas cistatinas apresentam a região C-terminal estendida. O grupo III compreende as cistatinas que apresentam as regiões conservadas dentro da superfamília, porém não possuem a seqüência consenso característica das fitocistatinas. Os membros do grupo IV não apresentam nem o consenso N-terminal e nem o motivo QXVXG, conservado entre os membros da superfamília (Reis & Margis, 2001).

Em nosso laboratório foram caracterizadas quatro cistatinas da cana-de-açúcar: canacistatinas 1, 2, 3 e 4, ou CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 (Soares-Costa *et al*, 2002; Gianotti *et al*, 2006, Gianotti *et al*, 2008). Todas essas cistatinas demonstraram uma eficiente inibição contra catepsinas humanas e outras cisteíno peptidases (Oliva *et al*, 2004; Gianotti *et al*, 2006), sendo que a CaneCPI-4 foi capaz de inibir fortemente catepsina B ($K_i = 0,83$ nM). Foi também avaliado o efeito dessa cistatina em relação a habilidade invasiva em uma linhagem celular de câncer mamário humano (MDA-MB-231) em ensaios em Matrigel em que foi verificado a redução de

cerca de 60% no processo de invasão celular com 0,2 μM da cistatina recombinante (Gianotti *et al*, 2008).

Dados da literatura têm demonstrado extensivamente a relevância do envolvimento das catepsinas, em especial da catepsina B, em processos de invasão e metástase tumoral, portanto a caracterização de cistatinas que inibam eficientemente estas catepsinas apresenta uma importante abordagem na procura por inibidores específicos contra estas catepsinas.

1.4. Evolução molecular direta de proteínas

Nos últimos anos aumentou o interesse por proteínas com propriedades melhoradas para aplicações na medicina, indústria ou meio ambiente. Progressos nesta área têm ocorrido, principalmente, devido aos avanços no desenvolvimento de métodos experimentais para criação de diversidade genética e para as pesquisas nas populações de genes encontrando funções nas proteínas correspondentes que possam ser alteradas e melhoradas (Arnold *et al*, 1999).

Uma das estratégias para se aperfeiçoar determinadas propriedades de proteínas com funções importantes é realizada por meio de evolução molecular direta de proteínas. Uma vantagem deste método é que poucas informações são necessárias para melhorar uma característica desejada (Stemmer, 1994).

A obtenção de proteínas por evolução molecular direta pode ser realizada por meio da técnica de “DNA shuffling” (ou embaralhamento de DNA). “DNA shuffling” é um método de recombinação homóloga “in vitro” de um conjunto de genes relacionados, por meio de fragmentação ao acaso e reagrupamento, utilizando a reação em cadeia da polimerase (do inglês: PCR – “polymerase chain reaction”) (Stemmer, 1994). É uma técnica bastante prática que acelera o processo em que um gene pode

evoluir pelos efeitos de mutações benéficas em seus fenótipos. Esta tecnologia vem se estendendo em diversas aplicações como na fabricação de uma grande quantidade de proteínas que têm sido geneticamente modificadas e na produção de vacinas (para a utilização de proteínas em terapias gênicas) e para produção de moléculas de interesse farmacêutico (Patten *et al*, 1997).

A técnica de “DNA shuffling” se aplica em um processo ao acaso, no qual a PCR é utilizada para criar uma biblioteca de genes mutados e por meio de métodos de seleção genética identifica-se o mutante que mais se aproxima das propriedades desejadas (Figura 5).

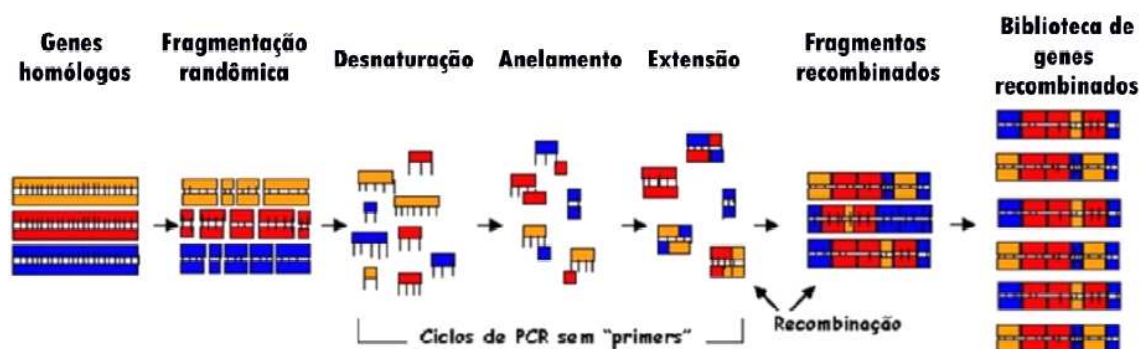


Figura 5: “DNA shuffling”. Representação esquemática das etapas de “DNA shuffling” a partir de uma família de genes homólogos e utilizando a digestão enzimática para gerar fragmentação randômica. Os fragmentos se pareiam durante a reação de PCR (primeiramente sem adição de oligonucleotídeos iniciadores). A mistura de fragmentos pareados é submetida a outra reação de PCR agora com a adição de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a obtenção de uma população de genes mutantes no tamanho do fragmento do (s) gene (s) parental (is), originando a biblioteca de recombinantes (adaptado de Moore e Maranas, 2002).

A evolução molecular direta de proteínas tem sido adotada pela indústria e constatada a eficiência no melhoramento de enzimas, bem como o envolvimento de novas vias metabólicas (Chen *et al*, 2001). Atualmente, estas alterações vêm sendo aplicadas em uma variedade de enzimas com o intuito de aumentar seu potencial de ação, desenvolvendo proteínas com propriedades funcionais melhoradas (Kikuchi, *et al*, 1999; Brideau-Andersen *et al*, 2007; Xiong *et al*, 2007).

Nos estudos de Soares-Costa (2004) uma biblioteca de “DNA shuffling” foi construída utilizando duas fitocistatinas, uma isolada da cana-de-açúcar: a CaneCPI-1 (Soares-Costa *et al*, 2002) e outra que foi isolada do arroz OC-I (Abe *et al*, 1987), para obtenção de uma nova cistatina com atividade inibitória melhorada contra a catepsinas humanas B, K e L. Um clone denominado A10PL3 formado a partir destas duas proteínas por meio da técnica de “DNA shuffling” foi expresso, purificado e submetido a testes de inibição de atividade enzimática, os quais demonstraram que esta proteína gerada possui uma melhor atividade inibitória (em relação aos seus precursores) contra a Catepsina B.

Frente a esses resultados, fica evidente a necessidade de estudos adicionais que dêem continuidade a este trabalho. O desenvolvimento de mutantes, nos quais as alterações sejam revertidas, isoladamente, no clone A10PL3, junto a estudos estruturais dessas cistatinas podem contribuir para o entendimento do mecanismo de ação de inibição dessas cistatinas, em especial para o mecanismo de inibição de catepsina B. Dessa forma, estes dados permitirão a disponibilização de novos caminhos para a obtenção de potenciais inibidores da catepsina B, uma cisteíno peptidase amplamente envolvida no processo tumoral.

1.5. Modelagem molecular de proteínas

Após grandes avanços na área da genômica, um dos maiores desafios é a elucidação da estrutura e função das proteínas codificadas pelos genes descobertos. A compreensão dos fenômenos biológicos na linguagem molecular tem tido um papel cada vez mais relevante. Dessa maneira, grandes esforços têm sido realizados no sentido de elucidar o maior número possível de estruturas tridimensionais terciárias e

quaternárias das proteínas (Heineimann, 2000; Novell & Machalek, 2000; Terwilliger, 2000).

Embora haja avanços e inovações técnicas na área de cristalografia de raios-X e a ressonância magnética nuclear (RMN), a obtenção de amostras em quantidades suficientes para os ensaios é, em muitos casos, difícil e os cristais obtidos nem sempre têm a qualidade necessária para o trabalho experimental (Maggio & Ramnarayan, 2001). Por outro lado, a elucidação da seqüência de aminoácidos é uma tarefa relativamente mais simples e atualmente, um grande número de estruturas primárias encontra-se disponível em bancos de dados públicos. Em consequência, foram desenvolvidas novas tentativas de elucidação de estruturas tridimensionais de proteínas por métodos puramente teóricos, sendo o objetivo maior a modelagem de proteínas por métodos “ab initio”, que consistem em produzir a estrutura tridimensional de proteínas a partir de sua estrutura primária (Ortiz *et al*, 1998; Simons *et al*, 1997; Simons *et al*, 1999). A determinação da estrutura tridimensional por este método é ainda um desafio devido à ausência de algoritmos capazes de simular de maneira precisa os processos de enovelamento e empacotamento. Apesar destas dificuldades, progressos na predição das estruturas tridimensionais de peptídeos e pequenas proteínas pelos métodos de “ab initio” têm sido relatados (Bradley *et al*, 2005; Wu *et al*, 2007; Walsh *et al*, 2009).

Outra maneira, mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (Johnson *et al*, 1994; Santos Filho *et al*, 2001; d’ Afonso *et al*, 2001). A modelagem de uma proteína pelo método de homologia é fundamentada no conceito de evolução molecular, ou seja, parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias desta proteína e de proteínas homólogas de estrutura tridimensional conhecidas implica em similaridades estruturais entre elas e que pequenas mudanças na

seqüência, em geral, resultam em, apenas, sutis modificações na estrutura tridimensional (Nayeem *et al*, 2006).

A qualidade de modelos estruturais de proteínas gerados por modelagem comparativa e a sua aplicação no processo de desenvolvimento de novos fármacos dependem, predominantemente, do grau de similaridade seqüencial entre a proteína com estrutura resolvida (proteína-molde) e a proteína a qual se deseja modelar (proteína-alvo). De maneira resumida, o processo de obtenção de um modelo protéico por meio da modelagem molecular por homologia estrutural envolve quatro etapas principais (Figura 6): i) busca de proteínas homólogas; ii) alinhamento das seqüências, iii) construção e aperfeiçoamento dos modelos; iiiii) validação dos modelos (Hillisch *et al*, 2004).

Diversos exemplos da utilização desta abordagem para a construção de modelos moleculares virtuais de alvos terapêuticos são encontrados na literatura (Nayeem, *et al*, 2006; Hillisch *et al*, 2004). Ring e colaboradores (1993) identificaram inibidores de serino e cisteíno peptidases com base no uso de modelos moleculares. Diller & Li (2003) descreveram o planejamento de inibidores de tirosina e serina/treonina quinases. Os autores realizaram uma triagem virtual de compostos com propriedades similares a fármacos, utilizando modelos construídos por homologia estrutural na faixa de 30 a 70 % de identidade seqüencial com estruturas depositadas no banco de dados de proteínas-“Protein data Bank” (PDB).

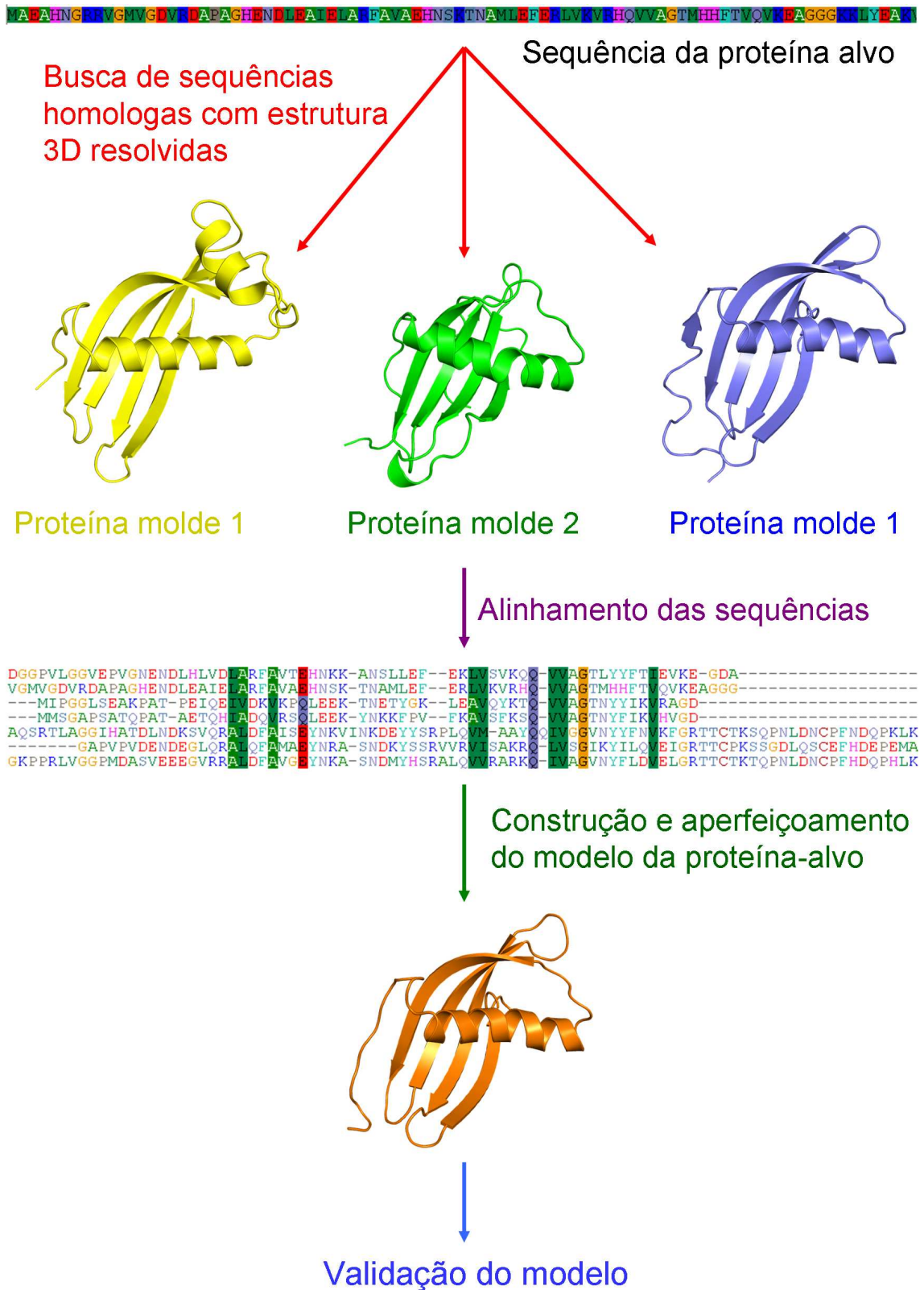


Figura 6: Modelagem molecular de proteínas por homologia. Etapas envolvidas no processo de obtenção de modelos protéicos de proteínas-alvo através da utilização da estratégia de modelagem molecular por homologia estrutural. Fonte: modificado de Da Silva & Silva, 2007.

Os modelos de proteínas gerados por homologia podem ser aplicados para a identificação do sítio ativo de um potencial alvo terapêutico, em que estudos de mutações de ponto são aliados a ensaios “in vivo” e / ou “in vitro”, bem como nas simulações computacionais envolvendo o modelo da proteína-alvo. Essa estratégia permite a identificação de resíduos de aminoácidos que são funcionalmente ou estruturalmente importantes na proteína-alvo. Tais modelos também podem ser úteis na validação de uma proteína-alvo. Uma das formas mais utilizadas na validação de proteínas-alvo consiste na administração de compostos farmacologicamente ativos que têm ação seletiva para a proteína em questão e estudo dos efeitos em modelo animal. É possível desenvolver pequenas moléculas baseadas em modelos por homologia e, então, usar estes compostos como ferramentas no estudo do papel fisiológico da respectiva proteína-alvo (Bredel & Jacoby, 2004; Hillisch, *et al*, 2004).

Modelos com alto grau de confiabilidade podem ser promissores na busca de compostos biologicamente ativos, bem como na otimização de protótipos servindo como base estrutural para a verificação de hipóteses em química medicinal, como por exemplo, no planejamento de fármacos seletivos a um determinado alvo terapêutico.

Dentro deste contexto, a elucidação da estrutura tridimensional de inibidores de peptidases da cana-de-açúcar poderá contribuir para a elucidação de sua função, fornecer novos dados que auxiliem na elucidação do mecanismo de inibição e no estudo de novas proteínas que possam vir a ser utilizadas para o controle biológico contra agentes fitopatogênicos, não só para a cana-de-açúcar, mas para outras culturas de relevância comercial. Além disso, estes estudos podem contribuir para o desenvolvimento de fármacos e de novos alvos moleculares, uma vez que as proteinases, em mamíferos, possuem uma função importante no processo de

catabolismo intracelular de peptídeos e proteínas e estão envolvidas em diversas patologias humanas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo tem como objetivo principal reverter as mutações individuais do clone híbrido A10PL3 (resultante da construção de uma biblioteca de “DNA shuffling”) por meio de mutações sítio-dirigidas, testar a atividade destes mutantes contra as catepsinas humanas B e L, e elucidar a estrutura tridimensional destas proteínas por modelagem por homologia. Tais estudos poderão contribuir para o melhor entendimento da função e do mecanismo de ação destas cistatinas.

2.2. Objetivos específicos

- Construção de três mutantes revertentes por meio de mutação sítio-dirigida.
- Expressão em *E.coli* e purificação das cistatinas mutantes.
- Realização dos ensaios de inibição de atividade enzimática das catepsinas humanas B e L.
- Estudos estruturais através de modelagem molecular por homologia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise da fase aberta de leitura do clone A10PL3

Inicialmente, foi realizado o re-seqüenciamento do clone A10PL3 obtido a partir da construção de uma biblioteca de “DNA shuffling” resultante da recombinação entre uma cistatina da cana-de-açúcar, CaneCPI-1, e uma cistatina do arroz a, OC-1, desenvolvida na tese de doutorado da aluna Andrea Soares da Costa no laboratório de Biologia Molecular da UFSCar sob orientação do Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, concluída em 2004 (Soares-Costa *et al*, 2004).

O re-seqüenciamento foi feito pelo método dideoxi (Sanger, 1977). As seqüências dos clones CaneCPI-1, OC-1 e A10PL3 foram alinhadas utilizando a interface MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) para a confirmação das seqüências dos mesmos e delineamento experimental para a construção dos novos mutantes.

3.2. Expressão e purificação das proteínas CaneCPI-1, OC-1 e A10PL3

3.2.1. Expressão recombinante em *E.coli*

Para a realização da expressão das cistatinas foi utilizado o sistema pET (Novagen) desenvolvido para a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Os clones recombinantes foram transformados em cepas de *E. coli* Rosetta (DE3), a qual possui o fragmento DE3 que codifica a RNA polimerase do bacteriófago T7 que permite a transcrição do gene subclonado no vetor pET28a sob o controle do promotor T7. Essa cepa também possui uma mutação no gene da enzima da lactose permease (lacY) sendo possível a entrada de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) de maneira uniforme na célula permitindo o ajuste no nível de expressão protéica. Além

disso, essa cepa contém genes para tRNAs codificados em plasmídeos resistentes ao cloranfenicol, específicos para os códons AGG, AGA, AUA, CCC e GGA, que são raramente utilizados pela *E. coli*, permitindo a expressão neste hospedeiro de genes heterólogos que possuam esses códons.

A expressão foi realizada conforme descrito por Soares-Costa (2004). Inicialmente, os plasmídeos: pET28a_CaneCPI-1, pET28a_OCI e pET28a_A10PL3, foram utilizados para transformar as células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3). Uma colônia correspondente a cada plasmídeo foi adicionada em um inóculo contendo 10mL de meio de cultura LB líquido adicionado de 25µg/mL dos antibióticos canamicina e cloranfenicol, mantido sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C por um período máximo de 18 horas. Em seguida, foi realizada a diluição de 1:1000 em 500 mL de meio LB líquido contendo 25µg/mL dos mesmos antibióticos a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até atingir uma densidade óptica (D.O) de 0,6 no comprimento de onda de 600nm (correspondente a fase logarítmica do crescimento bacteriano). Nesta densidade óptica foi coletado 1ml de cada amostra para serem utilizadas como controle não induzido e em seguida, a expressão induzida pela adição de IPTG para uma concentração final de 0.4mM. Após 4 horas de indução foram coletadas alíquotas de 1 mL para posterior análise da expressão das proteínas em SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970). Após o período de indução, as células foram coletadas, centrifugadas a 7.000 rpm, a 4 °C por 10 mim em centrífuga Sorval RC5C plus e submetidas ao teste de solubilidade. Para isso, os precipitados bacterianos contendo as células foram solubilizados em tampão de lise pH 8,0 (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Tris 10 mM) e submetidos à lise celular por meio de sonicação por 5 vezes de 60 segundos com intervalos de 30 segundos à potência de 20%, utilizando o sonicador Sonic Desmenbrator 500 (Fisher Scientific). Após esse processo, uma nova centrifugação foi

realizada a 13.000 rpm, a 4 ° C por 15 minutos para a separação das frações solúvel e insolúvel, das quais foram coletados amostras de 1 mL (sobrenadantes e precipitados), para posterior análise em SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970). Os sobrenadantes foram utilizados para purificação das proteínas na sua forma nativa em coluna de resina de níquel (Ni-NTA superflow – QIAGEN).

3.2.2. Purificação das proteínas

O método cromatográfico utilizado no presente estudo foi o de cromatografia de afinidade em que foram utilizadas colunas de 5 mL de resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), conforme descrito por Soares-Costa e colaboradores (2002). A coluna foi composta por um ligante fixado covalentemente a uma matriz, capaz de interagir especificamente com a proteína de interesse. Na cromatografia de afinidade, ao passar a mistura protéica pelo complexo matriz-ligante ocorre uma interação entre a proteína alvo e o ligante imobilizado. As demais proteínas são retiradas por várias lavagens da coluna. Como as proteínas foram expressas em fusão a uma “cauda” de seis histidinas derivadas do vetor pET28a (fusionadas em seu N-terminal) que, por sua vez, tem a capacidade de ligação níquel, estas puderam ser purificadas em etapa única.

Na cromatografia de afinidade as proteínas são separadas por suas especificidades de ligação. A cauda de histidinas permite a ligação ao Ni-NTA (Níquel-Ácido Nitrilacético), e esta cauda, em grande parte dos casos, não interfere na estrutura ou função das proteínas expressas. A cromatografia de afinidade por metal imobilizado usa o ligante quelado ao ácido nitrilacético (NTA), que é carregado com íons Ni²⁺. Neste tipo de purificação utiliza-se o composto imidazol para realizar a eluição da proteína, já que o anel imidazólico que é parte integrante da estrutura da histidina se liga aos íons níquel imobilizados pelos grupos NTA na matriz.

Dessa maneira, as frações solúveis contendo as cistatinas recombinantes foram passadas pelas respectivas colunas (preparadas em seringa descartável de 10 ml, deixando 5 ml de resina de nível empacotada), previamente equilibradas com 3 volumes (15mL) do mesmo tampão usado no passo de lise por meio de sonicação (Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM e NaH₂PO₄, pH:8.0). Em seguida foi passado o sobrenadante com cerca de 50 ml e novamente passado 3 volumes (15ml) do tampão de lise. A eluição das proteínas recombinantes foi realizada passando-se pela resina 2 volumes de tampão de lise contendo concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). O imidazol apresenta forte afinidade pelo níquel e compete com as histidinas pela ligação ao metal, liberando a proteína de fusão. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970).

As proteínas expressas e purificadas foram submetidas à diálise utilizando membranas (Pierce) de MWCO:3.500 (Spectrum Laboratories) contra dois litros de tampão contendo Tris-HCl 10 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 10 mM, pH 8.0. Foram feitas quatro trocas de tampão a cada duas horas e o sistema foi mantido a 4°C. Em seguida, foram determinadas as concentrações das proteínas segundo Bradford (1967) usando o reagente “Bio Rad Protein Assay” (Bio-Rad) e albumina sérica bovina como padrão e estas foram visualizadas em SDS/PAGE 15% (Laemmli, 1970). Se necessário, as proteínas foram concentradas em colunas de centriprep YM-3 (Amicon Bioseparations- Millipore). Oito mL das soluções contendo as proteínas puras foram adicionadas aos filtros, os quais foram centrifugados a 4000 rpm, 4° C.

3.3. Construção das cistatinas mutantes pelo método de mutação sítio-dirigida

Na busca de um melhor entendimento relacionado ao aumento da especificidade e atividade inibitória da proteína híbrida A10PL3 contra a catepsina B humana, foram

construídas três cistatinas mutantes pelo método de mutação sítio-dirigida, no qual cada uma das duas alterações foi revertida conforme os precursores originais (OC-1 e CaneCPI-1) isoladamente, resultando nos clones denominados como Mutantes I e II e simultaneamente, ou seja, com a reversão das duas alterações juntas, o que deu origem ao Mutante III.

Para a obtenção dos mutantes foi utilizado o Kit “Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis System” (Invitrogen), que tem como princípio uma metodologia rápida e altamente eficiente baseado nas propriedades da DNA metilase e *McrBC* endonuclease. O processo é dividido em três etapas principais: a) reação de metilação; b) amplificação em reação de mutagênese; c) transformação dos mutantes (Figura 7). O método consiste em uma reação de metilação e em outra de mutagênese (por PCR), em que o plasmídeo metilado serve como molde para a reação de amplificação a partir de oligonucleotídeos iniciadores ou “primers” que se sobrepõem, sendo que um deles deverá ser portador da alteração desejada. O produto resultante dessa amplificação é transformado na cepa *E. coli* DH5 α ™ – T1^R, a qual circulariza o DNA linear mutado, e através da atividade de endonuclease *McrBC* digere o DNA metilado que serviu como molde na reação de amplificação que originou o DNA mutado.

Para a reversão dos aminoácidos foi realizado alinhamento entre as seqüência da CaneCPI-1, OC-1 e A10PL3. Foram escolhidos dois aminoácidos para serem alterados, isoladamente: a treonina 17 (trinca CAA modificada pela trinca CAT que codifica uma Isoleucina), a Glutamina 84 (trinca CAG modificada pela trinca CTG que codifica uma Leucina) e uma terceira mutação que envolvia as duas alterações simultaneamente (a treonina para isoleucina e a glutamina para leucina).

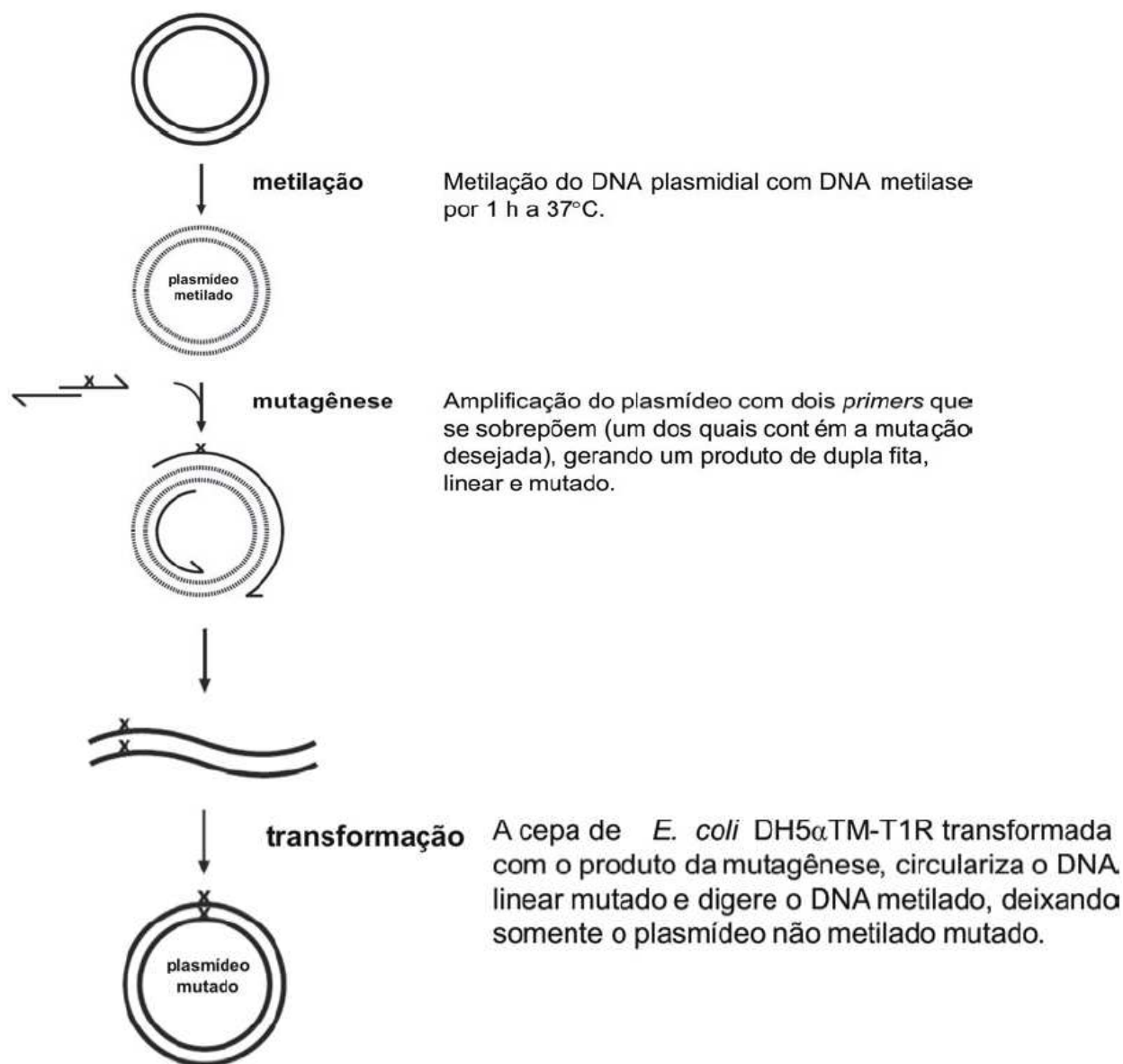
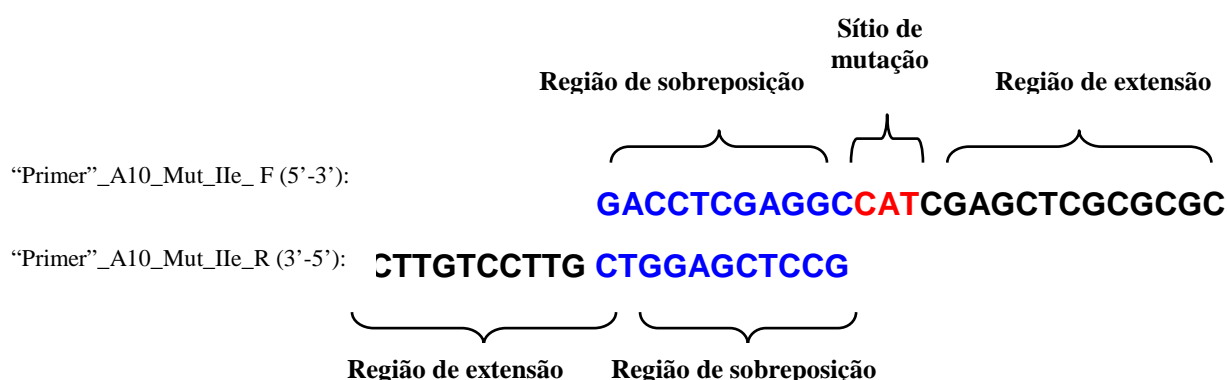


Figura 7: Representação esquemática do funcionamento do Kit “Gene TailorTM Site-Directed Mutagenesis System” (Invitrogen). Fonte: Invitrogen.

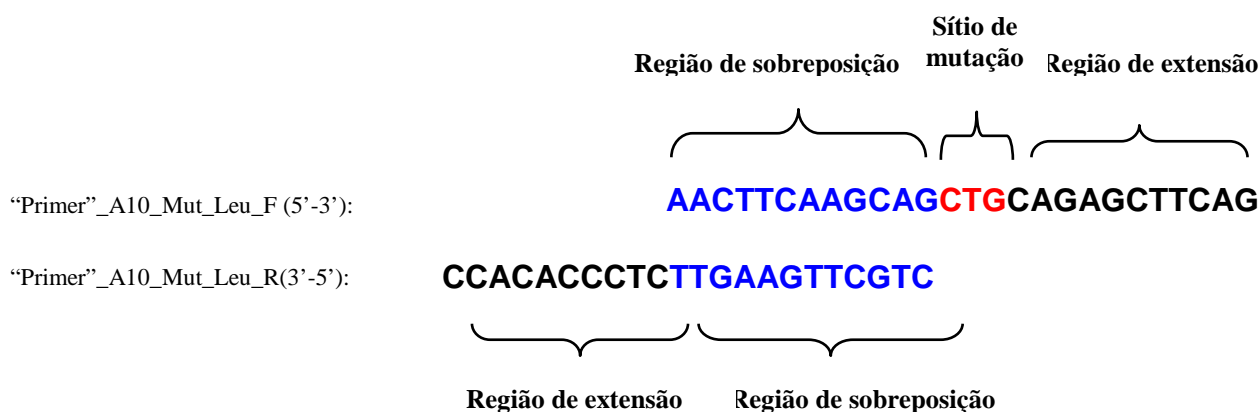
Para cada mutação foram construídos oligonucleotídeo iniciadores seguindo as instruções do fabricante (Gene TailorTM Site-Directed Mutagenesis System” Invitrogen). O oligonucleotídeo iniciador “sense” (“primer forward”) contém o sítio para a mutação localizada “downstream” e adjacente à região de sobreposição entre os dois oligonucleotídeos. O oligonucleotídeo iniciador “anti-sense” (“primer reverse”) deve ser complementar ao oligonucleotídeo anterior na região 5’ em pelo menos 10 bases (região

de sobreposição). Devem ser colocadas bases adicionais em cada oligonucleotídeo chamada de região de extensão para que haja um pareamento correto e eficiente durante a reação de PCR. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores referentes a cada mutante estão representadas abaixo:

a) **Mutante I:** (Thr → Ile)



b) **MutanteII:** (Gln → Leu)



c) **Mutante III:** (Thr → Ile) e (Gln → Leu)

Os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores anteriores foram utilizados. Os iniciadores referentes à mutação I foram utilizados quando o molde correspondeu ao clone Mutante II e os iniciadores referentes à mutação II, quando o molde correspondeu ao clone mutante I.

Em primeiro, 100ng do plasmídeo pET28a_A10PL3 foram metilados em uma reação contendo tampão de metilação, SAM 10x e 4 U da enzima DNA metilase, deixados a 37°C por um período de uma hora. Após isso, foram realizadas as reações de mutações utilizando-se como molde o plasmídeo metilado na reação anterior. Foram utilizados 13,0 ng de molde metilado, 2.5 U de “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen), tampão de reação 1X (Tris-HCL 100 mM pH 8,5, KCL 500 mM), 0,2 mM de DNTPs e 3 mM de MgSO₄, 10 picomoles de cada oligonucleotídeo iniciador. As reações foram realizadas em um termociclador PTC- 100 TM JM “Research Thermocycler” com a seguinte programação: 94 °C por 2 minutos, seguido por 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 68 °C- 6 minutos (segundo recomendações do fabricante utiliza-se um minuto de extensão para cada kb de DNA: 5369 pb do vetor Pet28a + 282 pb do gene da A10PL3 = 5661pb), e por último 68 °C por 10 minutos.

Em seguida, 5 µl da reação descrita acima foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH5αTM-T1^R disponíveis no kit, as quais possuem a habilidade de circularizar o DNA mutado e também apresentam a endonuclease *McrBC* que tem a capacidade de digerir o DNA metilado, que foi utilizado como molde. Após esse processo os clones foram seqüenciados pelo método dideoxi (Sanger, 1977) e analisados para escolha dos mutantes.

Para a obtenção do mutante III o mesmo processo descrito acima foi realizado, entretanto foi utilizado como molde o plasmídeo já contendo o Mutante I (pET28a_Mut_I) e os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes à mutação II. O inverso também foi realizado, utilizando como molde o plasmídeo contendo à mutação II (pET28a_Mut_II) e os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes a mutação I.

Os clones recombinantes que continham as mutações desejadas foram utilizados para transformar células de *E. coli* Rosetta (DE3) CaCl₂ competentes para posterior expressão e purificação.

3.3.1. Expressão e purificação das proteínas mutantes I, II e III

A expressão e purificação das proteínas Mutantes I, II e III foram realizadas, conforme já descrito nos item 3.2.1 e 3.2.2 (páginas 27 e 29) e os resultados foram analisados em SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970).

3.4. Ensaio de inibição de atividade enzimática das catepsinas humanas B e L

A atividade inibitória das cistatinas: CaneCPI-1, OC-1, A10PL3 e Mutantes I, II e III foi testada contra as catepsinas B e L humanas (Calbiochem). Os testes foram realizados em colaboração com a Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona do Departamento de Biofísica da UNIFESP. Todos os ensaios foram realizados em cubeta de quartzo mantida em compartimento termostático a 37°C, sob agitação e em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, utilizando o espectrofluorímetro HITACHI-2000 com comprimentos de onda de 380 nm de excitação e de 460 nm de emissão.

As catepsinas B e L foram ativadas com 2,5 mM de DTT (dithiothreitol) (DTT, ICN Biomedicals Inc., USA) por um período de cinco minutos. Nesse passo, o DTT é utilizado como agente redutor do resíduo e cisteína presente no sítio ativo das cisteíno peptidases. O substrato utilizado nesses ensaios foi o Z-Phe-Arg-MCA (carbobenzoxicarbonil-phe-arg-7-amino-4-metilcoumarina) (SIGMA) em uma concentração final de 0,001 mM. Após incubação durante dois minutos foram adicionadas diferentes concentrações dos inibidores.

A hidrólise dos substratos para cisteíno-peptidases (Z-Phe-Arg-MCA) foi monitorada pelo aumento da fluorescência devido à quebra dos mesmos. Desta forma, o aumento da fluorescência é proporcional a velocidade da reação. Os valores nas velocidades de hidrólise obtidos na ausência de inibidor (V_0) e na presença de diferentes concentrações de inibidor (V_i) são utilizados para gerar um gráfico, em que a inclinação da reta (ou “slope”) determina o valor da constante de inibição aparente (K_i app). Os valores obtidos de K_i app dos complexos enzima-inibidor foram calculados segundo Morrison (Knight, 1986) utilizando o programa GraFit na versão 5.0 (Leatherbarrow, 1992).

3.5. Modelagem molecular

Os estudos de modelagem molecular foram gentilmente realizados pelo Dr. Napoleão Valadares sob a supervisão do professor Richard Charles Garratt, do Instituto de Física da USP- São Carlos, e foram de grande relevância para a realização do trabalho aqui apresentado.

As seqüências de aminoácidos referentes à orizacistatina-1 (OC-1) e à estefina B humana foram obtidas a partir do banco de dados “Swiss-Prot” (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/index.html>), com os códigos de identificação P09229 e P04080, respectivamente. As estruturas tridimensionais das proteínas foram obtidas no banco de dados de proteínas PDB (<http://www.pdb.org>), cujos códigos de acesso são 1EQK e 1STF, respectivamente.

As seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (<http://www.clustal.org/download/current/>). Foi realizada a sobreposição das estruturas tridimensionais das proteínas selecionadas e o alinhamento entre as duas seqüências foi feito de maneira manual e ajustado de acordo com a observação visual do papel de cada

resíduo de aminoácido dentro do contexto da estrutura secundária e terciária, bem como na comparação dos ângulos ϕ e ψ . As seqüências das cistatinas foram então alinhadas a esse modelo.

Modelos de modelagem por homologia correspondentes a cada um desses alinhamentos foram obtidos por meio do programa Modeller 9v5 (Sali & Blundell, 1993), o qual objetiva satisfazer as restrições espaciais derivadas do alinhamento e das estruturas molde. Diversos modelos diferentes foram gerados, e a qualidade de cada um deles foi avaliada utilizando a função de pseudo-energia do programa Modeller e a pontuação de Dope (Shen, 2006). Os modelos também foram avaliados de maneira independente por meio dos programas PROCHECK (Laskowski, 1996), VERIFY 3D (Lüthy, 1992) e WHATIF (Vriend, 1993), e um modelo representativo foi selecionado para todo o processo de análise estrutural.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da fase aberta de leitura do clone A10PL3

O clone A10PL3 e as cistatinas CaneCPI-1 e OC-1 foram re-seqüenciados com sucesso e o alinhamento entre as seqüências traduzidas foi realizado para análise das alterações e estudos referentes a reversão das mesmas por meio de mutação sítio-dirigida.

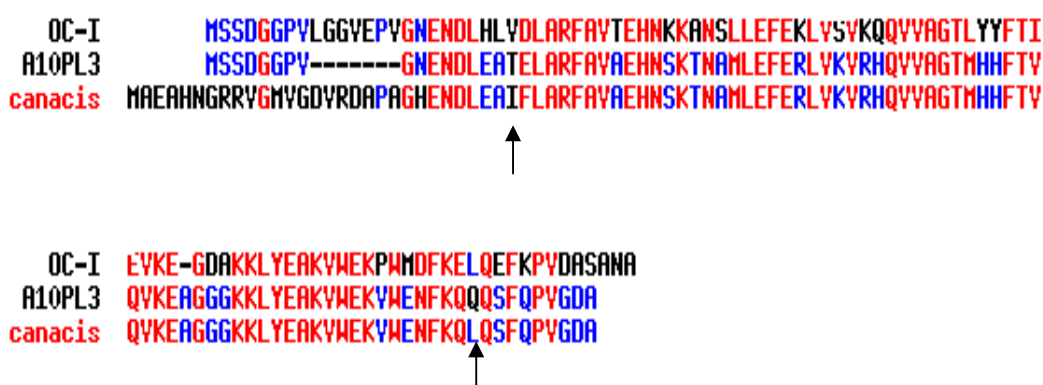


Figura 8: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das proteínas CaneCPI-1 (canacis), OC-1, e A10PL3. Em vermelho estão representados os resíduos de aminoácidos em comum entre as três proteínas. As setas indicam os pontos de alteração na seqüência do clone mutante A10PL3.

Conforme já descrito por Soares Costa (2004), na análise da seqüência protéica do clone A10PL3 alinhado a seus precursores (CaneCPI-1 e OC-1) foi possível observar que: i) este clone é muito similar ao parental CaneCPI-1; ii) que os domínios considerados entre as duas cistatinas se mantiveram e iii) que duas alterações pontuais ocorreram. Além disso, houve a deleção de uma seqüência de aminoácidos na região N-terminal subsequente à região MSSDGGPV da OC-1.

No presente estudo, foram revertidas as mutações ocorridas no clone A10PL3 devido ao processo de “DNA shuffling”. Para isso foi utilizada a metodologia de mutação sítio-dirigida, para que fosse testada a atividade enzimática inibitória destes

mutantes contra as catepsinas humanas B e L e compará-las com a atividade do clone híbrido original (A10PL3) e seus precursores, CaneCPI-1 e OC-1.

A análise da seqüência da proteína A10PL3 mostrou que o domínio QVVAG, altamente conservado entre as cistatinas e que participa da formação do primeiro “loop”, foi mantido. Bode e colaboradores (1988) demonstraram em seus estudos que o motivo QVV estabiliza o complexo enzima-inibidor fornecendo uma extensa área de contato com o sítio de ligação da peptidase.

Outro motivo que se manteve na proteína A10PL3 foi o domínio LARFAV muito conservado entre as cistatinas de plantas.

Estudos têm demonstrado que um resíduo do aminoácido glicina entre as posições 9 e 11 na região N-terminal da proteína parece ser importante durante o processo de inibição contra cisteíno peptidases por estar presente em uma provável região de ligação do inibidor no sítio da enzima (Abrahamson *et al*, 1987; Turk & Bode, 1991). Este resíduo de glicina se manteve conservado na posição 9 no caso da proteína A10PL3.

4.2. Construção dos Mutantes I, II e III

Foram realizadas três mutações sítio-dirigidas que corresponderam aos: Mutante I (Thr17Ile), Mutante II (Gln84Leu) e Mutante III (Thr17Ile) (Gln84Leu).

Nos estudos de mutagênese, a primeira alteração foi feita partindo-se do ponto em que um resíduo de isoleucina, proveniente da CaneCPI-1 e um resíduo de valina da OC-1, foram substituídos por um resíduo de treonina na posição 17 na seqüência do clone A10PL3, próximo ao motivo LARFAV, o qual como já visto, é altamente conservado entre as fitocistatinas. A mutação foi feita pela reversão do resíduo de treonina novamente para um resíduo de isoleucina, chamado então de Mutante I

(Thr17Ile). A reversão foi realizada dessa forma, pois o clone A10PL3 apresenta maior similaridade entre as seqüências de resíduos de aminoácidos com o parental CaneCPI-1 (o qual possui o resíduo de isoleucina).

A substituição do aminoácido leucina na posição 84 por uma glutamina ocorreu em uma região próxima à região de formação do segundo “loop”, região que contém um resíduo de triptofano, a qual faz parte de outro provável sítio de ligação da enzima. Este resíduo de leucina se mantém conservado nesta posição entre as cistatinas e a substituição do resíduo de leucina pelo resíduo de glutamina na proteína A10PL3 poderia influenciar de alguma maneira na estrutura e atividade da mesma. Sendo assim, o resíduo de aminoácido de glutamina foi substituído pelo resíduo de leucina resultando no Mutante II (Gln84Leu).

O Mutante III (Thr17Ile) (Gln84Leu) é formado pela reversão de forma simultânea das duas alterações: o resíduo de treonina pelo resíduo de isoleucina na posição 17 e um resíduo de glutamina por um resíduo de leucina na posição 84.

Os clones obtidos foram submetidos ao seqüenciamento pelo método dideoxi (Sanger, 1977) e as alterações desejadas foram encontradas (Figura 9).

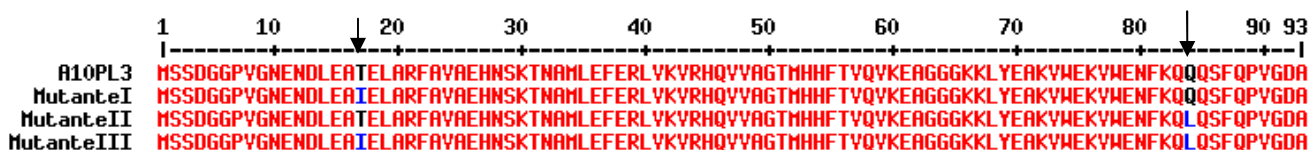


Figura 9: Alinhamento representativo entre as fases abertas de leitura das cistatinas mutantes A10PL3, Mutantes I, II e III. A10PL3: mutante obtido pela técnica de “DNA shuffling”; Mutante I: correspondente a alteração de um resíduo de treonina por um resíduo do aminoácido isoleucina; Mutante II: correspondente a alteração de um resíduo de glutamina por um resíduo do aminoácido leucina; Mutante III: correspondente às duas alterações anteriores (Mutantes I e II), simultaneamente. As setas correspondem aos pontos de alteração.

4.3. Análises de expressão e purificação das cistatinas: CaneCPI-1, OC-1, A10PL3, Mutantes I, II e III :

A expressão heteróloga das cistatinas recombinantes: CaneCPI-1, OC-1, A10PL3, Mutantes I, II e III foi realizada em cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) competentes pelo método de cloreto de cálcio. A comparação dos perfis protéicos dos clones bacterianos induzidos e não induzidos pela análise em SDS PAGE 15%, revelou a presença das bandas de tamanhos esperados, levando-se em consideração a soma entre a cauda de histidina e a cistatina, nos clones induzidos referentes à superexpressão das cistatinas (tamanho aproximado de 14 KDa) (Figura 10, canaletas 2 e 3 de todos os géis).

Na análise em SDS PAGE 15% das frações solúveis e insolúveis resultantes da lise bacteriana pôde ser observado que as cistatinas CaneCPI-1 e OC-1, Mutante II e Mutante III encontravam-se em sua maior parte na fração solúvel, enquanto a maior parte da cistatina híbrida A10PL3 foi encontrada na fração insolúvel, conforme já anteriormente constatado por Soares-Costa (2004) (Figura 10- A, B, D,F e C, canaletas 4 e 5, respectivamente). A maior parte da cistatina Mutante I também foi encontrada na fração insolúvel (Figura 10-D, canaletas 4 e 5), exibindo um perfil semelhante ao encontrado na expressão da proteína A10PL3 (Figura 10-C, canaletas 4 e 5).

As frações solúveis foram utilizadas para a purificação das cistatinas recombinantes por cromatografia de afinidade em coluna contendo resina de níquel. O sistema foi eficiente, pois o resultado visualizado em SDS-PAGE 15 % mostrou que as proteínas fixaram-se na resina, foram eluídas e apresentaram-se puras na fração de 250mM (Figura 10, canaleta 6 de todos os géis). O processo de eluição ocorre, pois o imidazol possui afinidade pelo níquel e compete com a proteína ligada a ele, deslocando-a da resina. Assim, dependendo da concentração de imidazol contida no

tampão de eluição a proteína é eluída. Embora uma pequena quantidade das proteínas de fusão A10PL3 e Mutante I encontraram-se na fração solúvel, estas foram capazes de se ligarem à resina e também foram eluídas na fração de 250 mM de imidazol (Figura 10-C e D, canaleta 6).

Todas as proteínas apresentaram-se puras. Para as cistatinas CaneCPI- 1 e OC-1 foi alcançado um rendimento de 10 mg de proteína por litro de cultura celular. Para os Mutantes I e II foi alcançado um rendimento maior em torno de 30 mg. Já para as cistatinas A10PL3 e Mutante I o rendimento alcançado foi em torno de 2 mg de proteína por litro de cultura celular.

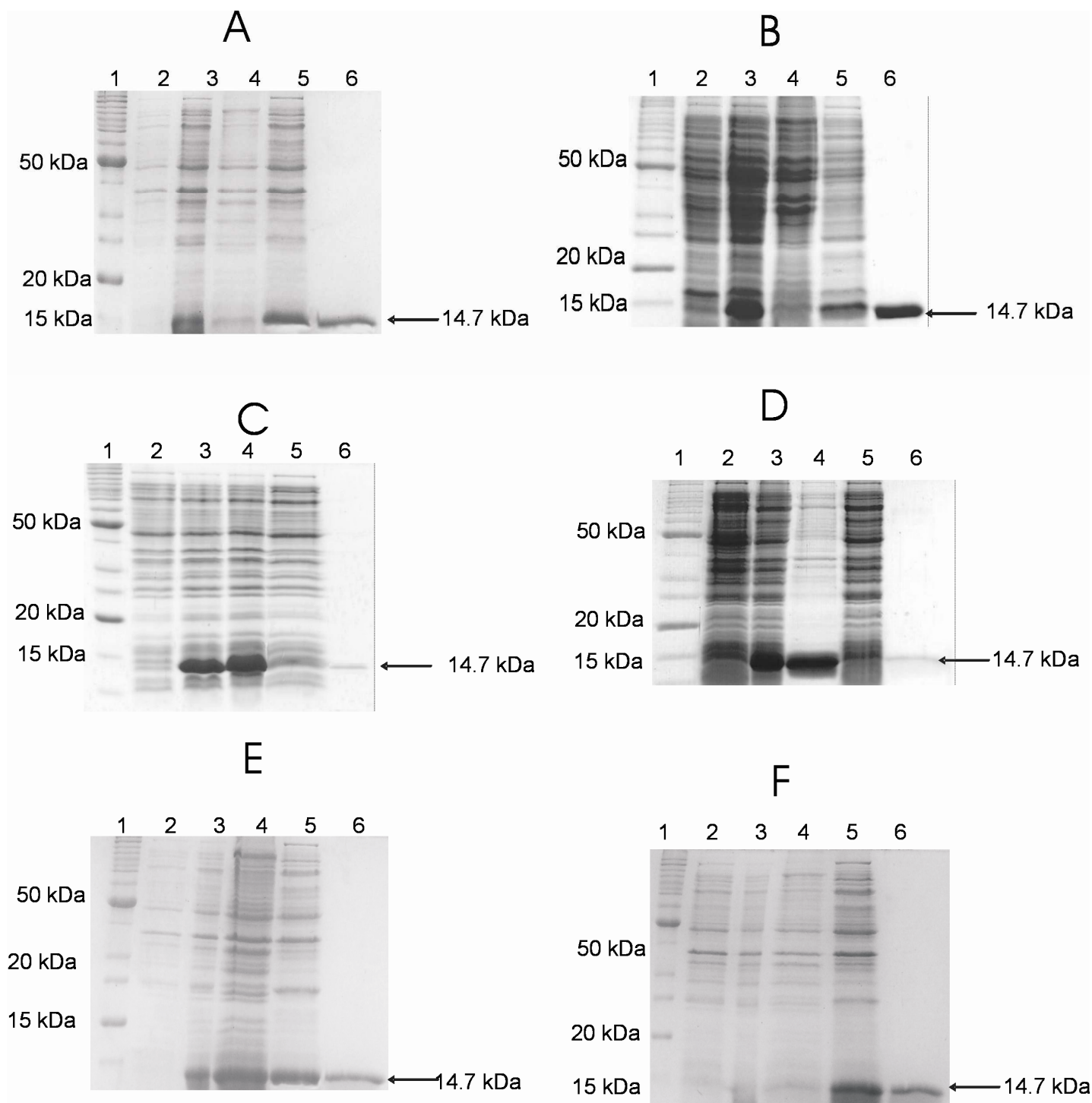


Figura 10: Expressão heteróloga e purificação das cistatinas. Expressão heteróloga e purificação das cistatinas CaneCPI-1 (A), OC-1 (B), A10PL3 (C), Mutante I (D), Mutante II (E) e Mutante III (F). Análise em SDS-PAGE 15 % das amostras coletadas das culturas não induzidas (canaletas 2) e induzidas (canaletas 3); das frações insolúveis (canaletas 4) e solúveis (canaletas 5) resultantes do processo de lise celular; e das frações purificadas em coluna com resina de níquel (canaletas 6); canaletas 1: marcador de peso molecular (Invitrogen)

4.4. Ensaios de inibição de atividade das catepsinas humanas B e L

Para os testes de atividade inibitória das cistatinas contra as catepsinas humanas B e L foi utilizado o espectrofluorímetro Hitachi F2000 e o substrato fluorogênico Z-PhE-Arg-MCA. Foram calculadas as constantes de inibição aparente ($K_{i\text{app}}$) para cada uma das cistatinas purificadas e os resultados estão sumarizados na Tabela 1. A constante de inibição $K_{i\text{app}}$ indica a concentração de inibidor necessária para a diminuição em 50% da velocidade da hidrólise do substrato pela enzima. Para que um inibidor seja considerado potente, a afinidade desse inibidor pela enzima alvo deve ser tão alta que o seu valor de $K_{i\text{app}}$ é menor ou igual à concentração total da enzima utilizada no ensaio (Copeland, 2005). As cistatinas recombinantes aqui testadas apresentaram diferentes resultados em relação à atividade inibitória contra as catepsinas B e L.

Tabela 1. Constantes de Inibição ($K_{i\text{app}}$) calculadas para cada uma das cistatinas recombinantes contra as catepsinas humanas B e L.

Cistatinas	$K_{i\text{app}}$ (nM)	
	Catepsina B	Catepsina L
CaneCPI- 1	125	0,6
OC-I	112	4.4
A10PL3	16	9,8
Mutante I	NI*	11,6
Mutante II	NI*	70,4
Mutante III	NI*	75

NI: ausência de inibição: não inibição

Pelos ensaios de inibição foi possível constatar que todas as cistatinas inibiram a atividade da catepsina L. O melhor resultado encontrado foi referente à inibição pela cistatina Cane CPI-1 ($K_{i\text{app}}$ 0,6 nM) (Tabela 1, Figura 11).

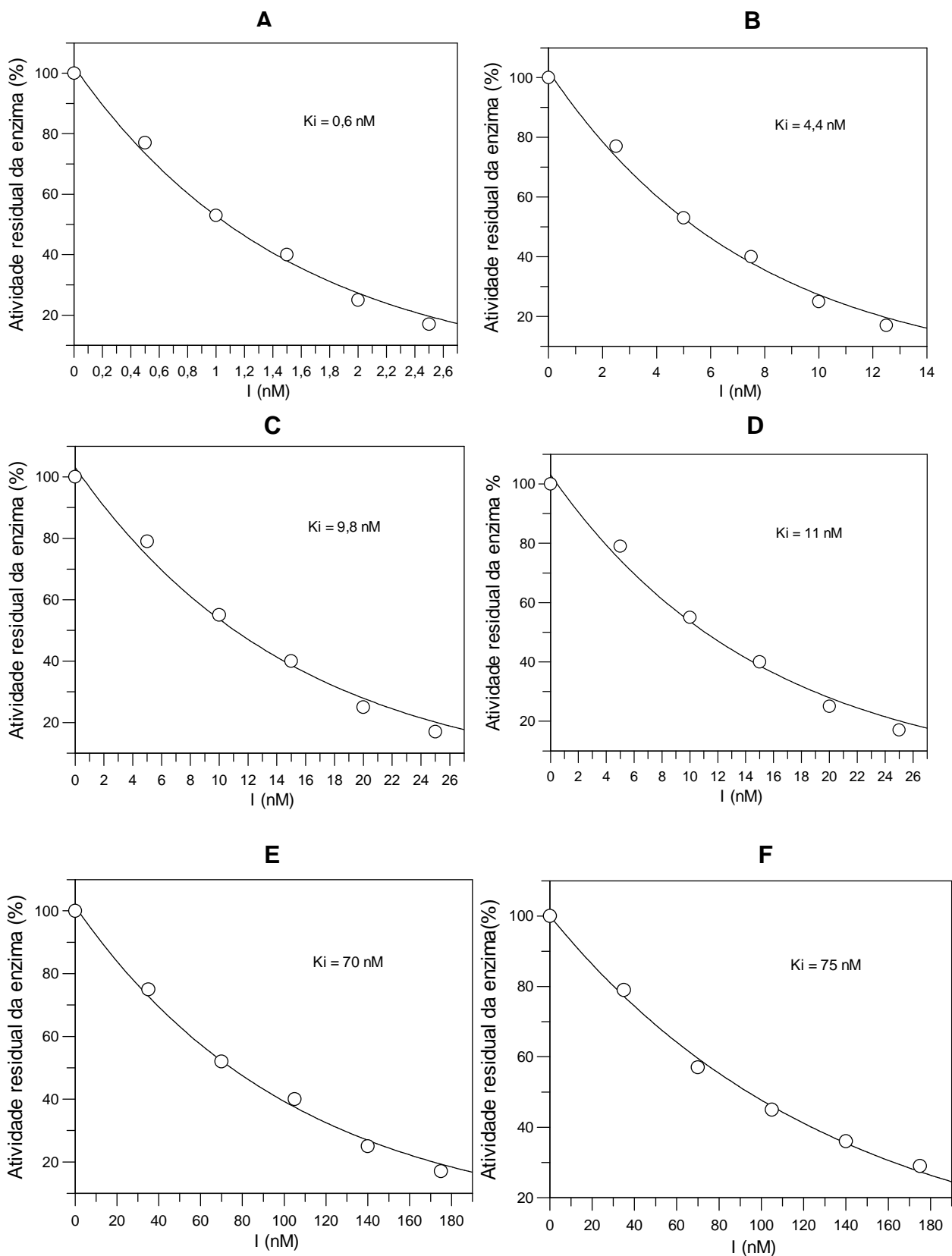


Figura 11: Inibição da atividade da catepsina L humana pelas cistatinas recombinantes. A atividade inibitória das cistatinas CaneCPI-1 (em A), OC-1(em B) A10PL3 (em C), Mutante I (em D), Mutante II (em E) e Mutante III (em F) contra a catepsina L foi medida em um ensaio fluorimétrico (em triplicatas) utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA. A atividade residual da enzima foi calculada através da inclinação (“slopes”) das retas geradas com o programa FL “Solutions” 2.0 e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ensaio sem a cistatina).

A maior diversificação de resultados foi encontrada em relação à atividade inibitória contra a catepsina B, uma vez que se sabe que esta catepsina possui poucos inibidores específicos (Barret, 1987). Os resultados revelaram que nem todas as cistatinas recombinantes foram capazes de inibir a atividade da catepsina B (Tabela 1). O melhor resultado de inibição contra essa enzima foi encontrado para a cistatina híbrida A10PL3 (Ki_{app} 16 nM) que apresentou uma considerável atividade inibitória. Já os mutantes I, II e III (referentes às reversões das mutações do clone A10PL3) não exibiram valores detectáveis de inibição contra a catepsina B (Tabela 1, Figura 12).

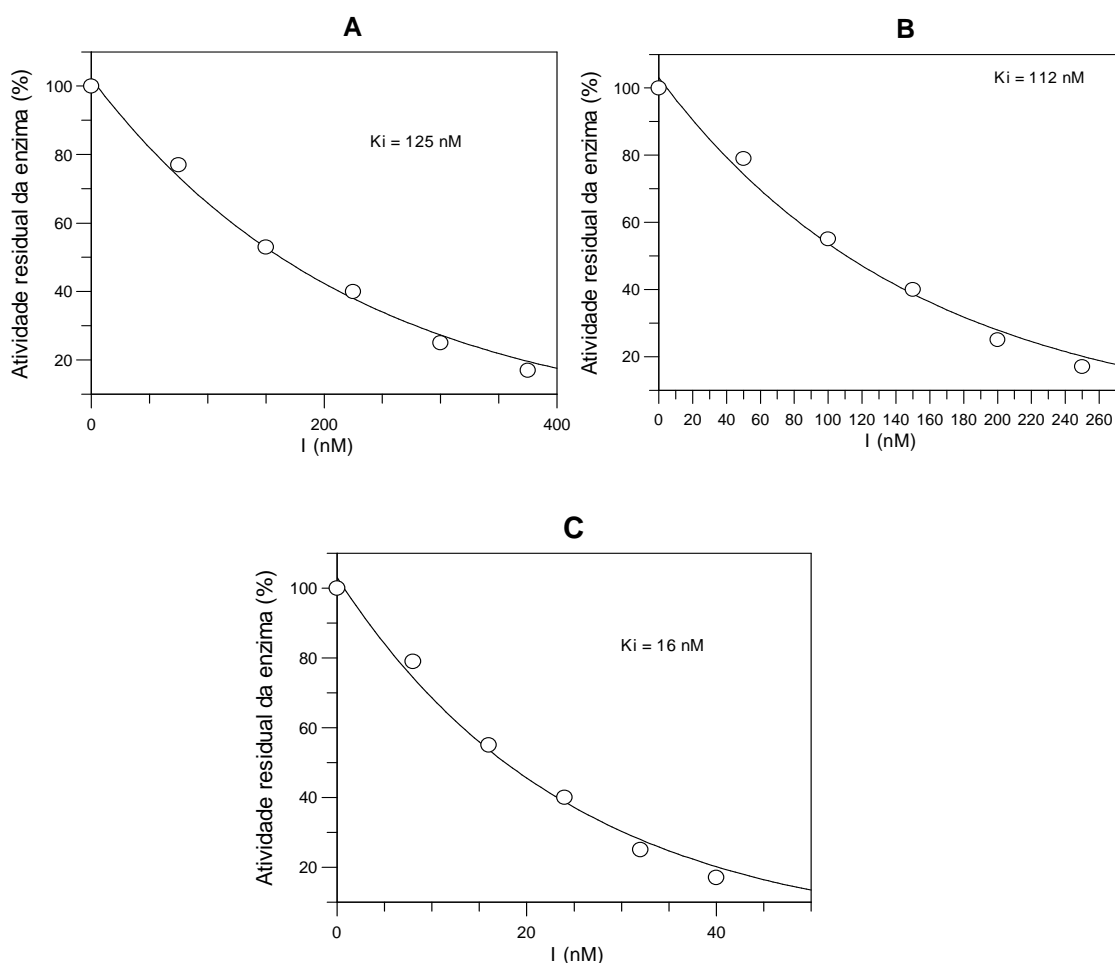


Figura 12: Inibição da atividade da catepsina B humana pelas cistatinas recombinantes. A atividade inibitória das cistatinas CaneCPI-1 (em A), OC-1(em B) e A10PL3 (em C) contra a catepsina B foi medida em um ensaio fluorimétrico utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA. A atividade residual da enzima foi calculada através da inclinação (“slopes”) das retas geradas com o programa FL “Solutions” 2.0 e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ensaio sem a cistatina).

Embora o clone A10PL3 apresente alto grau de identidade com a sequência de aminoácidos de seus precursores OC-1 e CaneCPI-1, sua atividade inibitória contra catepsina B humana foi muito maior que a de outras fitocistatinas apresentadas nesse estudo. Além disso, o resultado obtido em relação aos mutantes I, II e III que, não foram capazes de inibir a catepsina B sugere que estas mutações, que estão longe do sítio de interação da cistatina com cisteíno peptidases, induziram alterações estruturais que afetaram a região de reconhecimento e ligação a catepsina B.

Em comparação com outras cisteíno proteases a catepsina B é uma enzima que contém um elemento estrutural extra, o “loop” de oclusão, compreendendo os resíduos 104-106, que bloqueia o sítio ativo da enzima limitando o acesso a esta região pelo inibidor (Björk *et al*, 1994). Conforme já visto, as cistatinas inibem catepsinas através de ligação competitiva ao sítio ativo, no entanto, a conformação deste “loop” na catepsina B torna incompatível a ligação das cistatinas. A influência do “loop” no acesso ao sítio ativo é refletida em altos valores de constante de inibição para a maior parte das cistatinas quando comparados àqueles obtidos de cisteíno proteases que não possuem esse “loop” (Barrett *et al*, 1986; Ohtsubo *et al*, 2005 ou 07; Martinez *et al*, 2005).

A Catepsina B é uma das mais abundantes cisteíno peptidases de mamíferos e sua eficiente inibição tem uma considerável importância patofisiológica, pois esta catepsina tem sido associada à progressão de tumores malignos (Xing, 1998).

O envolvimento de catepsinas lisossomais no processo de invasão celular e metástase tumoral é frequentemente relatado na literatura, pois essas cisteíno peptidases têm a capacidade de degradar componentes da lâmina basal e da matriz extracelular (Kos & Lah, 1998; Zajc *et al*, 2002; Zajc *et al*, 2003, Erdem *et al*, 2007; Bradley *et al*, 2008; Herszényi *et al*, 2008). A presença de inibidores protéicos que se ligam

fortemente à enzima impedindo a ligação dela ao substrato é a principal via de controle da atividade das cisteíno peptidases. Vários estudos sugerem que o desequilíbrio entre a expressão e / ou a atividade das catepsinas e seus respectivos inibidores endógenos está associado ao desenvolvimento do fenótipo invasivo e metastático da célula tumoral. A diminuição da concentração de cistatinas acarreta em um aumento da atividade das catepsinas, ocasionando um desequilíbrio que irá resultar no maior potencial invasivo e conseqüentemente, na progressão do câncer (Skrzydowska *et al*, 2005). Com a intenção de se estabelecer o equilíbrio normal existente nas células, a utilização de cistatinas como agentes terapêuticos em novas estratégias anti-câncer tem sido sugerida (Klepper, 2006; Palermo & Joyce, 2008).

Os estudos já desenvolvidos em nosso laboratório por Soares Costa (2004), e Gianotti e colaboradores (2006, 2008) com relação à caracterização de quatro cistatinas da cana-de-açúcar (CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4) relatam as diferenças no potencial inibitório contra as catepsinas humanas B e L. A cistatina híbrida A10PL3 e a CaneCPI-4 foram capazes de inibir eficientemente a catepsina B com (K_i app de 16 e 0,83 nM, respectivamente). Além disso, conforme já citado, os ensaios realizados para se avaliar o potencial invasivo da cistatina CaneCPI-4 em uma linhagem celular de câncer mamário revelou a redução de cerca de 60% no processo de invasão celular com 0,2 μ M da cistatina recombinante (Gianotti *et al*, 2008). Portanto, esses estudos sugerem que a procura por inibidores de peptidases nas diferentes espécies de plantas representa outra abordagem a ser amplamente explorada em novos trabalhos.

Dessa maneira, fica evidente que a caracterização de novas cistatinas que inibam de maneira eficiente a catepsina B é de grande importância, considerando o envolvimento desta cistatina no processo de invasão tumoral, metástase além do seu envolvimento em artrite reumática, osteoporose e distrofia muscular. Além disso,

(na fita $\beta 3$), Tyr75, Ala77, Val79 (na fita $\beta 4$) e Leu90, Phe93 (na fita $\beta 5$). Próximo à extremidade N-terminal da hélice há uma pequena fita beta, que interage com a fita $\beta 2$ por meio de um padrão de interações de hidrogênio característico de folhas beta e também pelos contatos hidrofóbicos da cadeia lateral da Val15 com a Val50 na fita $\beta 2$. Na literatura atual, ainda não estão disponíveis dados de estudos cristalográficos referentes ao complexo formado entre a OC-1 e papaína, ou qualquer outra catepsina, entretanto prováveis pontos de interação foram propostos (Nagata *et al*, 2000), com base na estrutura cristalográfica do complexo estefina B com a papaína (código de acesso no PDB: 1STF) (Stubbs *et al*, 1990). O primeiro “loop” de interação da oryzacystatina-1 corresponde aos resíduos 53-57, apresentando uma seqüência altamente conservada Gln-Val-Val-Ala-Gly. O segundo loop de ligação apresenta um resíduo de prolina conservado seguido por um resíduo de triptofano ou histidina (Pro83 e Trp84 na OC-1) e a terceira região de interação é formada pela região N-terminal da cistatina.

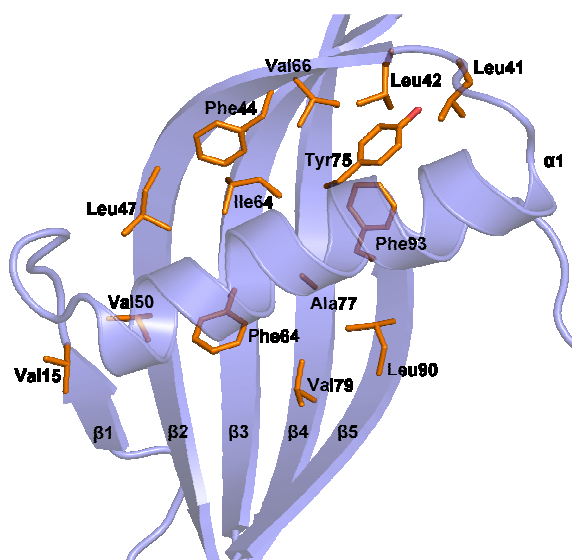


Figura 14: Estrutura tridimensional da Orizacistaina 1 (OC-1). Na figura está representado o enovelamento da proteína e os resíduos da folha beta que participam do núcleo hidrofóbico estão destacados em laranja. Código do PDB: 1EQK.

Quando comparados à OC-1, os resíduos presentes na folha β anti-paralela que participam da formação do núcleo hidrofóbico na CaneCPI-1 são conservados, com exceção de dois deles que apresentam mutações conservativas. Os resíduos que compõem a hélice apresentam alto grau de conservação, incluindo todos os resíduos no motivo LARFAV. Uma vez que o clone A10PL3 foi originado a partir de uma biblioteca de “DNA shuffling” obtida a partir das seqüências da OC-1 e da CaneCPI-1, a homologia da estrutura do modelo tridimensional gerado apresenta um elevado grau de semelhança com a da CaneCPI-1. As diferenças consistem na deleção de 7 aminoácidos na região N-terminal e duas mutações pontuais resultantes do processo de “DNA shuffling”: um resíduo de isoleucina passou a ser uma treonina no início da hélice, e um resíduo de leucina na fita β 5 foi substituído por um de glutamina.

As cistatinas são conhecidas como proteínas extremamente flexíveis e esta propriedade é ilustrada pela sua capacidade de fazer a troca de domínios (do inglês: “domain swapping”) (Janowski *et al*, 2001; Staniforth *et al*, 2001; Janowski *et al*, 2004), se organizar em diferentes estados oligoméricos (Ohtsubo *et al*, 2007; Jenko

Kokalj, 2007), formar de fibrilas amilóides (Wahlbom *et al*, 2007; Morgan *et al*, 2008) e interagir e inibir diferentes cisteíno peptidases, como a papaína e diferentes catepsinas (Nycander *et al*, 1998; Estrada *et al*, 1998; Pavlova *et al*, 2000; Pavlova & Björk, 2003; Gianotti *et al*, 2008).

Conforme ilustrado na Figura 15 - A, a primeira mutação (Ile30Thr) no início da hélice desestabiliza o agrupamento hidrofóbico formado por resíduos provenientes da fita $\beta 2$ (Leu53 e Phe50), da hélice (Arg34 e da própria Ile30) e do “loop” do conector do N-terminal para a hélice. A mutação II (Leu97Gln) enfraquece a outra parte do agrupamento hidrofóbico formada pelos resíduos de Leu32, Phe35 e Ala36 na hélice, Val86 na fita $\beta 4$ e Phe100 e Leu97 na fita $\beta 5$ (Figura 15 - B). Juntas, estas mutações abalam os alicerces das interações hidrofóbicas entre a hélice e a folha β , aumentando a flexibilidade do N-terminal, o que por sua vez, leva ao aumento da atividade inibitória.

Conforme já visto, a catepsina B possui um elemento estrutural extra, o loop de oclusão, que bloqueia o sítio ativo da enzima, limitando o acesso a esta região pelo inibidor (Björk *et al*, 1994). O mecanismo de inibição da catepsina B humana pelas cistatinas é um processo que ocorre em dois passos e requer o deslocamento do “loop” de oclusão. No primeiro passo ocorre a interação inicial da região N-Terminal das cistatinas com os subsítios S2 e S3 do sítio ativo da enzima. No segundo passo ocorre o deslocamento do “loop” de oclusão conforme a cistatina ancorada introduz seus dois “loops”, o central e o da região C-terminal nos subsítios S' (Nycander *et al*, 1998; Pavlova *et al*, 2000). Vários estudos têm destacado a importância da porção aminoterminal na atividade e especificidade das cistatinas (Auerswald *et al*, 1992; Björk *et al*, 1994; Lindahl *et al*, 1994; Shibuya *et al*, 1995; Hall *et al*, 1998). A eficiência na inibição da catepsina B parece estar relacionada com o segmento N-terminal da cistatina (Abrahamson *et al*, 1991; Björk *et al*, 1994). Como nos estudos Lindahl e colaboradores

(1994), os quais tiveram como base em modelos moleculares para a construção de uma cistatina C com uma mutação substituindo o resíduo de Val10 por um resíduo de Arg e compararam sua atividade com o inibidor selvagem. Esta mutação provocou um aumento no valor de K_i em 15 vezes para a catepsina B, e em 12.000 vezes para a papaína, mostrando que esta única substituição de aminoácidos afeta, de forma diferente, a especificidade do inibidor para as duas proteases-alvo. Outros estudos demonstraram que as afinidades da cistatina do ovo da galinha e da cistatina C foram diminuídas após a remoção da região N-terminal localizada antes do resíduo de glicina conservado (Abrahamson *et al*, 1991; Björk *et al*, 1994). Sendo assim, a especificidade das cistatinas por diferentes peptidases cisteínicas é parcialmente determinada por resíduos de aminoácidos da porção aminoterminal da molécula. Em nosso estudo, o aumento na flexibilidade do domínio N-terminal na proteína A10PL3, eventualmente separando-o do restante da molécula pareceu facilitar a sua interação inicial com a enzima e, portanto no processo de ligação e subsequente deslocamento do “loop” de oclusão, aumentando a capacidade inibitória deste clone contra a catepsina B humana, em relação aos seus precursores (CaneCPI-1 e OC-1).

Quatro dos resíduos conservados no motivo LARFAV presentes na hélice participam destas interações, portanto, pode-se sugerir que o papel desse motivo é desempenhar uma complementaridade ideal ao núcleo hidrofóbico das fitocistatinas, aumentando a estabilidade destas proteínas.

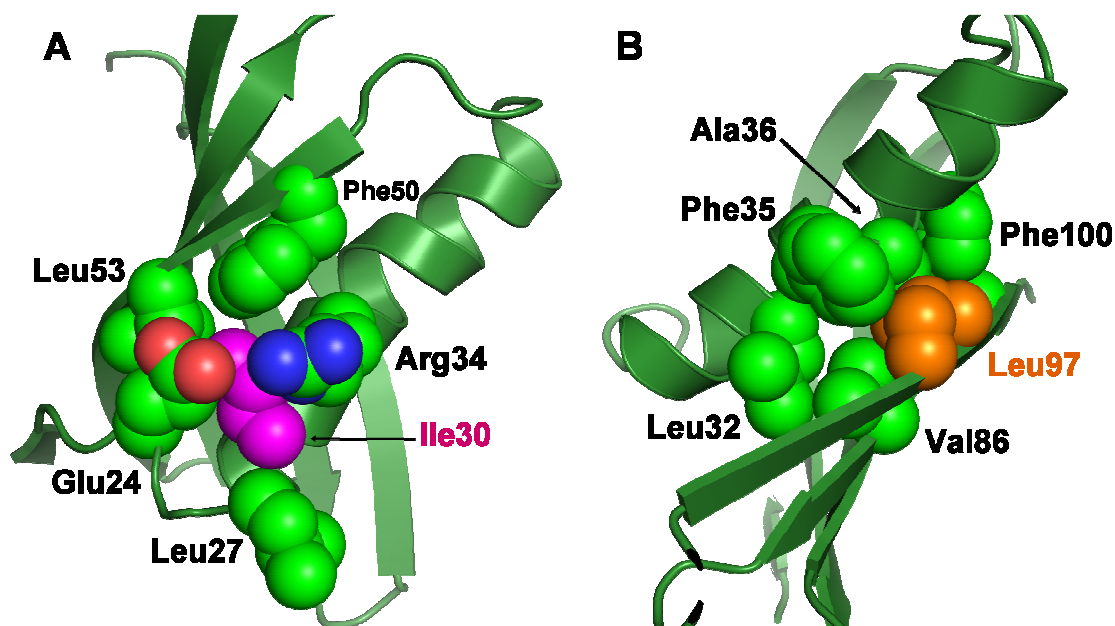


Figura 15: Modelo da estrutura tridimensional da Canacostatina-1 (CaneCPI-1). Modelo da CaneCPI-1 desenvolvido por meio de modelagem molecular por homologia mostrando os resíduos correspondentes as mutações pontuais no clone A10PL3. Em A: interações de isoleucina 30 (magenta). Em B: interações de leucina 97 (laranja). As interações entre os resíduos estão marcadas e mostrados como esferas.

O estudo dos modelos de modelagem molecular também sugerem que as mutações desestabilizaram as interações entre a fita $\beta 2$ e a região N-terminal, tornando-a mais flexível, e assim influenciando no aumento da atividade inibitória da catepsina B. Esse efeito ocorre particularmente no caso do clone A10PL3 (Val24Thr) e da CaneCPI-1 (Val24Gln, Val50Gly). Esses resultados corroboram com estudos que mostram que a inibição da catepsina B envolve o deslocamento do “loop de oclusão”, e que este mecanismo envolve a ligação do N-terminal da cistatina na catepsina B (Pavlova, & Björk, 2003), o qual é favorecido por mutações que propiciem um aumento da flexibilidade nesta parte dos inibidores da peptidase.

Além disso, clones que apresentam a falta de interações no núcleo hidrofóbico, como no caso do clone A10PL3 (Leu90Gln) e da CaneCPI-4 (Leu41Gly), apresentam a tendência de serem menos solúveis, provavelmente devido à sua incapacidade para adotar uma formação compacta, resultando na exposição de alguns dos resíduos do

núcleo hidrofóbico, o que pode levar à agregação. Este tipo de mutação pode também contribuir para o aumento da flexibilidade da cistatina, influenciando sua atividade inibitória.

As diferenças observadas na solubilidade das cistatinas recombinantes expressas em *E.coli* se refletem nas possíveis diferenças estruturais entre essas proteínas. Em relação aos três mutantes construídos, foi verificado que a solubilidade dessas proteínas foi afetada de maneira significativa. O mutante I apresentou solubilidade muito baixa, comparável a do clone A10PL3. A possível explicação seria que esta proteína mantém a troca de um resíduo de Leu por um resíduo de Gln que afeta o centro hidrofóbico entre a hélice alfa e a folha beta. É provável que esta mutação provoque a desestabilização na interação da hélice alfa com a folha beta, resultando na exposição de grande parte da região hidrofóbica e como consequência disso, a falta de solubilidade. Já o Mutante II, que envolve a troca do resíduo de treonina pelo resíduo de isoleucina apresentou maior solubilidade com relação às proteínas Mutante I e A10PL3. Essa alteração parece afetar uma região menor da estrutura uma vez que não está concentrada no centro do núcleo hidrofóbico, resultando na exposição de um menor número de resíduos hidrofóbicos e, conseqüentemente sendo mais solúvel. No caso do Mutante III as alterações nos resíduos de aminoácidos mantiveram o núcleo hidrofóbico novamente intacto o que resultou na maior solubilidade dessa proteína em relação às mutantes I, II e à proteína A10PL3.

As catepsinas não só participam de vários processos fisiológicos como na apresentação de antígenos, remodelamento ósseo e cicatrização, mas também estão envolvidas em diversos processos patológicos, tais como artrite reumatóide, osteoporose e câncer (Vasiljeva *et al*, 2007). A catepsina B tem sido associada à progressão de tumores malignos e especificamente ao processo de invasão pela destruição da barreira

da matriz extracelular, ou indiretamente pela ativação de outras peptidases capazes de digerir a matriz extracelular (Dickinson, 2002). Portanto, o conhecimento do mecanismo de interação entre as catepsinas e seus inibidores (as cistatinas) é de extrema importância, pois a elucidação desse processo possibilitará o desenvolvimento de novas metodologias para a produção racional de inibidores específicos para peptidases fisiologicamente importantes. A obtenção de inibidores específicos permitirá o estudo individual da função de cisteinoproteases em um determinado sistema biológico, além da possível utilização em aplicações na área médica.

5. CONCLUSÕES

- Foi realizada a construção de três mutantes pelo método de mutação sítio dirigida com a finalidade de reverter às mutações do clone A10PL3.
- As cistatinas mutantes I, II e III foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade.
- Ensaios de inibição da atividade enzimática das catepsinas L e B humanas foram realizados com as cistatinas de cana-de-açúcar, A10PL3 e OC-I.
- As cistatinas testadas foram capazes de inibir a atividade da catepsina L.
- Nenhum dos Mutantes (I, II e III) foi capaz de inibir a atividade da catepsina B.
- A cistatina híbrida A10PL3 foi o que apresentou a maior capacidade inibitória contra a catepsina B ($K_i \approx 16$ nM).
- Foram realizados estudos estruturais por meio do desenvolvimento de modelos por modelagem molecular por homologia, os quais destacaram que as mutações no clone A10PL3 desestabilizaram as interações entre a fita β_2 e a região N-terminal, tornando-a mais flexível, e influenciando no aumento da atividade inibitória contra a catepsina B.
- A ausência de interações fundamentais no núcleo hidrofóbico no clone A10PL3 resultou na tendência de uma menor solubilidade, provavelmente devido à sua incapacidade para adotar uma formação compacta, que resultou na exposição de alguns dos resíduos do núcleo hidrofóbico, o que pode levar à agregação e também contribuir para o aumento da flexibilidade da cistatina, influenciando sua atividade inibitória.
- A dependência da atividade inibitória sobre a flexibilidade da região N-terminal da cistatinas indicou que a inibição da catepsina B pelas canacistatinas e todos os mutantes aqui apresentados, envolve o deslocamento do “loop” de oclusão

presente na catepsina B, que é um mecanismo semelhante ao proposto para as cistatinas humanas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). **J. Biol. Chem.**, v.262, p.16793-16797, 1987.

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **Eur. J. Biochem.**, v. 209(3), p. 933-7, 1992.

ABRAHAMSON, M.; RITONJA, A.; BROWN, M. A.; GRUBB, A.; MACHLEIDT, W.; BARRETT A. J. Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. **J. Biol. Chem.**, v. 262(20), p. 9688-94, 1987.

ABRAHAMSON, M.; MASON, R. W.; HANSSON, H.; BUTTLE, D. J.; GRUBB, A.; OHLSSON, K. Human cystatin C. role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase. **Biochem. J.**, v. 273 (3), p. 621-626, 1991.

ABRAHAMSON, M. Cystatins-Proteins Inhibitors of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Braziliam Association for the Advancement of Science**, v. 45(5), p. 299-203, 1993.

AL-SHEHRI, M. A. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. **Pakistan J. Biol. Sci.**, v. 7, p. 1631–1635, 2004.

ANTONOV, V. K. **Chemistry of Proteolysis**. Berlim: Springer-Verlog. 1993. 459 p.

ARAI, S.; MATSUMOTO, I.; EMORI, Y.; ABE, K. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6612–6617, 2002.

ARNOLD, F. H.; VOLKOV, A. A. Directed evolution of biocatalysts. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 3(1), p. 54-9, 1999.

AUERSWALD, E. A.; GENENGER, G.; ASSFALG-MACHLEIDT, I.; MACHLEIDT, W.; ENGH, R. A.; FRITZ, H. Recombinant chicken egg white cystatin variants of the QLVSQ region. **Eur. J. Biochem.**, v. 209(3), p. 837-45, 1992.

BARRETT, A. J.; KIRSCHKE, H. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. **Method Enzymol.**, v. 80, p. 535-561, 1981.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; DAVIES, M. E.; MACHLEIDT, W.; SALVESEN, G.; TURK, V. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In: **Proteinase inhibitors**. Amsterdam: Barrett, A. J. Salvensen, G. eds Elsevier Science Publisher. 1986. p. 515-569.

BARRETT, A. J. The Cystatins, a new class of peptidase inhibitors. **Trends. in Biochem. Sciences**, v.12, p. 193-196, 1987.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. **Method. Enzymol.**, v. 244, p. 1-15. 1994.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Academic Press, London. 2004.

BELENGHI, B.; ACCONCIA, F.; TROVATO, M.; *et al.* AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 2593–2604, 2003.

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. England: Oxford University Press. 1989.

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press. 2001. 340 p.

BJÖRK, I.; POL, E.; RAUB-SEGALL, E.; ABRAHAMSON, M.; ROWAN, A. D.; MORT, J. S. Differential changes in the association and dissociation rate constants for binding of cystatins to target proteinases occurring on N-terminal truncation of the inhibitors indicate that the interaction mechanism varies with different enzymes. **Biochem. J.**, v. 299, p. 219-25, 1994.

BLUNDELL, T. L. Metalloproteinase super-families and drug design. **Nature. Struct. Biol.**, v. 1, p. 73-75, 1994.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **Eur. J. Biochem.**, v. 204(2), p.433-51, 1992.

BODE, W.; ENGH, R.; MUSIL, D.; ET AL. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. **EMBO. J.**, v. 7(8), p. 2593-9, 1988.

BODE, W.; HUBER, R. S. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1477(1-2), p. 241-52, 2000.

BOUCHARD, E.; MICHAUD, D.; CLOUTIER, C. Molecular interactions between an insect predator and its herbivore prey on transgenic potato expressing a cysteine proteinase inhibitor from rice. **Mol. Ecol.**, v. 12(9), p. 2429-37, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P.; MALMSTRÖM, L.; QIAN, B.; SCHONBRUN, J.; CHIVIAN, D.; KIM, D. E.; MEILER, J.; MISURA, K. M.; BAKER, D. Free modeling with Rosetta in CASP6. **Proteins**, v. 61 Suppl 7, p. 128-134, 2005.

BRADLEY, W. H.; LIMA, P. H.; RODGERS, L.; BLOMQUIST, C.H.; DOWNS, L.S. Endometrial carcinoma expresses an increased cathepsin B/D ratio. **Gynecol. Oncol.**, v. 108(1), p. 84-9, 2008.

BREDEL, M.; JACOBY, E. Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. **Nature Reviews Genetics**, v. 05, p. 262-275, 2004.

BRIDEAU-ANDERSEN, A. D.; HUANG, X.; SUN, S. C.; CHEN, T. T.; STARK, D.; SAS, I. J.; ZADIK, L.; ET AL. Directed evolution of gene-shuffled IFN- α molecules with activity profiles tailored for treatment of chronic viral diseases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 104(20), p. 8269-74, 2007.

CHEN, Y. L.; TANG, T. Y.; CHENG, K. J. Directed evolution to produce an alkalophilic variant from a *Neocallimastix patriciarum* xylanase. **Can. J. Microbiol.**, v. 47(12), p. 1088-94, 2001.

COPELAND, R. A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**: a guide for medical chemists and pharmacologists. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

CORDES, C.; BARTLING, B.; SIMM, A.; AFAR, D.; LAUTENSCHLÄGER, C.; HANSEN, G.; SILBER, R. E.; ET AL. Simultaneous expression of Cathepsins B and K in pulmonary adenocarcinomas and squamous cell carcinomas predicts poor recurrence-free and overall survival. **Lung Cancer**, v. 64 (1), p. 79-85, 2009.

CORRE-MENGUY F, CEJUDO FJ, MAZUBERT C, VIDAL J, LELANDAIS-BRIERE C, TORRES G, RODE A, HARTMANN C. Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development. **Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 687–698, 2002.

DA SILVA, V. B & SILVA, C.H.T.P. Modelagem molecular de proteínas alvo por homologia estrutural. **Revista eletrônica de farmácia**. v. IV(1), P. 15-26, 2007. Disponível em <http://www.farmacia.ufg.br/revista/_pdf/vol4_1>.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. **J. Struct. Biol.**, v. 134(2-3), p. 246-56, 2001.

DEVETZI, M.; SCORILAS, A.; TSIAMBAS, E.; SAMENI, M.; FOTIOU, S.; SLOANE B. F.; TALIERI, M. Cathepsin B protein levels in endometrial cancer: Potential value as a tumour biomarker. **Gynecol. Oncol.**, v.112(3), p. 531-6, 2009.

DICKINSON, D. P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v. 13(3), p. 238-75, 2002.

DILLER, D. J.; LI, R. Kinases, homology models, and high throughput docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4638-4647, 2003.

DINIS, F. M.; MARTIN, A. M. (1999) Hidrolisado protéico do pescado. In: FURLAN E. F.; OETTERER M. Hidrolisado proteico do pescado. **Revista de ciência e tecnologia**, v. 10, p. 79-89, 2002.

DRENTH, J.; JANSONIUS, J. N.; KOEKOEK, R.; SWEN, H. M.; WOLTHENS, B. G. Structure of papain. **Nature**, v. 218, p. 929-932, 1968. In: Redzynia, I.; Ljunggren A.; BUJACZ, A.; ABRAHAMSON, M.; JASKOLSKI, M.; BUJACZ, G. Crystal structure of the parasite inhibitor chagasin in complex with papain allows identification of structural requirements for broad reactivity and specificity determinants for target proteases. **FEBS Journal**, v. 276 (3), p. 793-806, 2009.

ERDEM, N. F.; CARLSON, E. R.; GERARD, D. A.; ICHIKI, A. T. Characterization of 3 oral squamous cell carcinoma cell lines with different invasion and/or metastatic potentials. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v. 65(9), p. 1725-33, 2007.

ESTRADA, S.; NYCANDER, M.; HILL, N. J.; CRAVEN, C. J.; WALTHO, J. P.; BJÖRK, I. The role of Gly-4 of human cystatin A (stefin A) in the binding of target proteinases. Characterization by kinetic and equilibrium methods of the interactions of cystatin A Gly-4 mutants with papain, cathepsin B, and cathepsin L. **Biochemistry**, v. 37(20), p. 7551-60, 1998.

GIANOTTI, A.; Rios, W. M.; Soares-Costa, A.; Nogaroto, V.; Carmona, A. K.; Oliva M. L.; Andrade, S. S.; Henrique-Silva, F. Recombinant expression, purification, and

functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein. Expr. Purif.**, v. 47, p. 483-489, 2006.

GIANOTTI, A.; SOMMER, C. A.; CARMONA, A. K.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L. **Biol. Chem.**, v. 389(4), p. 447-453, 2008.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzimology**, 2d. Ed. Stockton Press Ed. US e Canadá, p. 609, 1996.

GUTIERREZ-CAMPOS, R.; TORRES-ACOSTA, J.; SAUCEDO-ARIAS, L. J.; GOMEZ-LIM, M. A. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1223–1226, 1999.

HALL, A.; EKIEL, I.; MASON, R. W.; KASPRZYKOWSKI, F.; GRUBB, A.; ABRAHAMSON, M. Structural basis for different inhibitory specificities of human cystatins C and D. **Biochemistry**, v. 37(12), p. 4071-9, 1998.

HEINEMANN, U. Structural genomics in Europe: slow start, strong finish? **Nat. Struct. Biol. Suppl.** p. 940-2, 2000.

HERSZÉNYI L, FARINATI F, CARDIN R, ISTVÁN G, MOLNÁR LD, HRITZ I, DE PAOLI M.; ET AL. Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. **BMC Cancer**, v. 10, p. 8:194, 2008.

HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 659-669, 2004.

HINES, M. E.; OSUALA, C. I.; NIELSEN, S. S. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1515-1520, 1991.

- HOOPER, N. M. Peptidases: a primer. **Essays. in Biochem.**, v. 38, p. 1-8, 2002.
- JANOWSKI, R.; KOZAK, M.; JANKOWSKA, E.; GRZONKA, Z.; GRUBB, A.; ABRAHAMSON, M.; JASKOLSKI, M. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. **Nat. Struct. Biol.**, v. 8(4), p. 316-20, 2001.
- JANOWSKI, R.; ABRAHAMSON, M.; GRUBB, A.; JASKOLSKI, M. Domain swapping in N-truncated human cystatin C. **J. Mol. Biol.**, v. 341(1), p. 151-60, 2004.
- JENKO KOKALJ, S.; GUNCAR, G.; STERN, I.; MORGAN, G.; RABZELJ, S.; KENIG, M.; STANIFORTH, R. A.; et al. Essential role of proline isomerization in stefin B tetramer formation. **J. Mol. Biol.**, v. 366(5), p. 1569-79, 2007.
- JOHNSON, M. S.; SRINIVASAN, N.; SOWDHAMINI, R.; BLUNDELL, T. L. Knowledge-based protein modeling. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 29(1), p. 1-68, 1994.
- JOSHI, B. N.; SAINANI, M. N.; BASTAWADE, K. B.; GUPTA, V. S; RANJEKAR P. K. Cysteine peptidase inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 246(2), p. 382-7, 1998.
- KEPPLER, D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. **Cancer Lett**, v. 235(2), p. 159-76, 2006.
- KIKUCHI, M.; OHNISHI, K.; HARAYAMA, S. Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes. **Gene**, v. 236(1), p.159-67, 1999.
- KNGHT, C.G. The characterization of enzyme inhibition. In: **Proteinase Inhibitors**. Amsterdam: Barrett, A. J.; Salvesen, G. Eds. Elsevier Publisher, 1986. p. 23-51.
- KURODA, M.; KIYOSAKI, T.; MATSUMOTO, I.; MISAKA, T.; ARAI, S.; ABE, K. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65(1), p. 22-8, 2001.

KOS, J.; LAH, T. T. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer. **Oncol. Rep.**, v. 5(6), p. 1349-61, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, v. 26, 1996.

LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine peptidases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chem. Rev.**, v. 102(12), p. 4459-88, 2002.

LEATHERBARROW, R. J. **Grafit, version 5.0**, Erithacus software Ltd; Stains, UK, 1992.

LINDAHL, P.; RIPOLL, D.; ABRAHAMSON, M.; MORT, J. S.; STORER, A. C. Evidence for the interaction of valine-10 in cystatin C with the S2 subsite of cathepsin B. **Biochemistry**, v. 33(14), p. 4384-4392, 1994.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356(6364), p. 83-5, 1992.

MAGGIO, E. T.; RAMNARAYAN, K. Recent developments in computational proteomics. **Drug Discov. Today.**, v. 6(19), p. 996-1004, 2001.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and Phylogenetic Relationships among Plant and Animal Cystatins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 359(1), p.24-30, 1998.

MARGIS, R AND REIS, E. M. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24(1-4), p.291-296, 2001.

MARTINEZ, M.; ABRAHAM, Z.; GAMBARDELLA, M.; ECHAIDE, M.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. The strawberry gene Cyf1 encodes a phytocystatin with antifungal properties. **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 1821–1829, 2005a.

MARTINEZ, M.; RUBIO-SOMOZA, I.; FUENTES, R.; LARA, P.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. The barley cystatin gene (Icy) is regulated by DOF transcription factors in aleurone cells upon germination. **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 547–556, 2005b.

MARTINEZ, M.; LOPEZ-SOLANILLA, E.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (gene Icy) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties. **Molecular Plant– Microbe Interactions**, v. 16, p. 876–883, 2003.

MARTINEZ, M.; DIAZ, I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. **BMC. Evol. Biol.**, v. 8, p. 198, 2008.

McGRATH, M. E. The lysosomal cysteine peptidases. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 28, p. 181-204, 1999.

MEGDICHE, W.; PASSAQUET, C.; ZOURRIG, W.; ZUILY FODIL, Y.; ABDELLY C. Molecular cloning and characterization of novel cystatin gene in leaves *Cakile maritima* halophyte. **J. Plant. Physiol.**, v. 28, 2008.

MÉNARD, R. Structure-function studies in the papain family of cysteine peptidases. **J Brazilian. Assoc. Advanc. Sci.**, v. 45, p. 292-298, 1993.

MOORE, G. L.; MARANAS, C. D. Predicting out-of-sequence reassembly in DNA shuffling. **J. Theor. Biol.**, v; 219(1), p. 9-17, 2002.

MORGAN, G. J.; GIANNINI, S.; HOUNSLOW, A. M.; CRAVEN, C. J.; ZEROVNIK E.; TURK, V.; WALTHO, J. P.; STANIFORTH, R. A. Exclusion of the native alpha-helix from the amyloid fibrils of a mixed alpha/beta protein. **J. Mol. Biol.**, v. 375(2), p. 487-98, 2008.

NAGATA, K.; KUDO, N.; ABE, K.; ARAI, S.; TANOKURA, M. Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. **Biochemistry**, v. 39(48):14753-60, 2000.

NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; JUNIOR, S.K. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. **Protein Science**, v. 15, p. 808-824, 2006.

NICKLIN, M. J.; BARRETT, A. J. Inhibition of cysteine proteinases and dipeptidyl peptidase I by egg-white cystatin. **Biochem. J.**, v. 223(1), p. 245-53, 1984.

NORTH, J. C.; MOTTRAM, G. H.; COOMBS, G. H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa, **Parasitol Today**, v. 6p. 270-275, 1990.

NORVELL, J. C.; MACHALEK, A. Z. Structural genomics programs at the US National Institute of General Medical Sciences. **Nat. Struct. Biol.** Suppl: 931, 2000.

NYCANDER, M.; ESTRADA, S.; MORT, J. S.; ABRAHAMSON, M.; BJÖRK, I. Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. **FEBS. Lett.**, v. 422(1), p. 61-4, 1998.

OHTSUBO, S.; TAIYOJI, M.; KAWASE, T.; TANIGUCHI, M.; SAITOH, E. Oryzacystatin-II, a cystatin from rice (*Oryza sativa* L. japonica), is a dimeric protein: possible involvement of the interconversion between dimer and monomer in the regulation of the reactivity of oryzacystatin-II. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 55(5), p. 1762-6. 2007.

OLIVA, M. L.; CARMONA, A. K.; ANDRADE, S. S.; COTRIN, S. S.; SOARES-COSTA, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory selectivity of canecystatin: a

recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 320(4), p. 1082-6, 2004.

ORTIZ, A. R.; KOLINSKI, A.; SKOLNICK, J. Fold assembly of small proteins using monte carlo simulations driven by restraints derived from multiple sequence alignments. **J Mol Biol**, v. 277(2), p. 419-48, 1998.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their Inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 133-171, 1997.

PALERMO, C.; JOYCE, J. A. Cysteine cathepsin peptidases as pharmacological targets in cancer. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 29(1), p. 22-8, 2008.

PAVLOVA, A.; KRUPA, J. C.; MORT, J. S.; ABRAHAMSON, M.; BJÖRK, I. Cystatin inhibition of cathepsin B requires dslocation of the proteinase occluding loop. Demonstration By release of loop anchoring through mutation of his110. **FEBS. Lett.**, v. 487(2), p. 156-60, 2000.

PAVLOVA, A.; BJÖRK, I. Grafting of features of cystatins C or B into the N-terminal region or second binding loop of cystatin A (stefin A) substantially enhances inhibition of cysteine proteinases. **Biochemistry**, v. 42(38), p. 11326-33, 2003.

PATTEN, P. A.; HOWARD, R. J.; STEMMER, W. P. C. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 724-733, 1997.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of serine peptidases. **Methods. Enzymol.**, v. 244:p. 19-61, 1994.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods. Enzymol.**, v. 248, p. 183-228, 1995.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. The peptidase database. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 28, p. 323-325, 2000.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; KOK, C. Y.; KONG, J.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 320–325, 2008.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial peptidases. **Microbiol. Molec. Biol.**, v. 62, p. 597-635, 1998.

REIS, E. M.; MARGIS, R. Sugarcane phytocystatins : identification, classification and expression pattern analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 1-4, p. 291-296, 2001.

RING, C. S.; SUN, E.; MCKERROW, J. H.; LEE, G. K.; ROSENTHAL, P. J.; KUNTZ, I. D.; COHEN, F. E. Structure-based inhibitor design by using proteins models for the development of antiparasitic agents. **PNAS.**, v. 90, p. 3583-3587, 1993.

RZYCHON, M.; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. Modes of inhibition of cysteine peptidases. **Acta. Biochim. Pol.**, v. 51(4), p. 861-73, 2004.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234 (3): 779-815, 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc.Natl.Acad.Science.**, v. 74, p.5463-5467, 1977.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine peptidases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Science,USA.**, v.74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS-FILHO, O.; DE CASTRO, R. B.; FIGUEROA-VILAR J. D. Homology modeling of wild type and pyrimethamine/cycloguanil-cross resistant dihydrofolate reductase. A model for antimalarial chemotherapy resistance. **Biophysical Chemistry**, v 91, p. 305-317, 2001.

SHIBUYA, K.; KAJI, H.; ITOH, T.; OHYAMA, Y.; TSUJIKAMI, A.; TATE, S.; TAKEDA, A.; KUMAGAI, I.; HIRAO, I.; MIURA, K.; et al. Human cystatin A is inactivated by engineered truncation. The NH₂-terminal region of the cysteine proteinase inhibitor is essential for expression of its inhibitory activity. **Biochemistry**, v. 34(38), p. 12185-1292, 1995.

SIMONS, K. T.; KOOPERBERG, C.; HUANG, E.; BAKER, D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions. **J. Mol. Biol.**, v. 268(1), p. 209-25, 1997.

SIMONS, K. T.; RUCZINSKI, I.; KOOPERBERG, C.; FOX, B. A.; BYSTROFF, C.; BAKER, D. Improved recognition of native-like protein structures using a combination of sequence-dependent and sequence independent features of proteins. **Proteins**, v.34(1), p. 82-95, 1999.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, C. R. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 781-785, 2001.

SIQUEIRA-JUNIOR, C. L.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; CUNHA, M.; GOMES, V. M.; MOURA, D.; JACINTO, T. 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defence protein and forms crystals in prosystemin over-expressing transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 247–254, 2002.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in peptidases. I Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 27, p. 157-162, 1967.

SHEN, M. Y.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein. Sci.**, v.11, p. 2507-24, 2006.

SHYU DJ, CHOU WM, YIU TJ, LIN CP, TZEN JT. Cloning, functional expression, and characterization of cystatin in sesame seed. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 52(5), p. 1350-6, 2004.

SKRZYDLEWSKA, E.; SULKOWSKA, M.; KODA, M.; SULKOWSKI, S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. **World. J. Gastroenterol.**, v. 11(9), p. 1251-66, 2005.

SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L. M.; THIEMANN, O. H.; HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 296(5), p. 1194-9, 2002.

SOARES-COSTA A. Expressão heteróloga, purificação e estudos de atividade de uma proteína inibidora de cisteíno peptidase da cana-de-açúcar e posterior evolução “in vitro” pela técnica de DNA “shuffling”. Tese de Doutorado (Doutorado em Genética e Evolução) - Programa de Pós-Graduação de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2004. Disponível em <<http://www.teses.>>. Acesso em 19 abr. 2004.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; LEVINE, A. The involvement of cysteine peptidases and peptidase inhibitor genes in programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 11, p. 431–444, 1999.

STANIFORTH, R. A.; GIANNINI, S.; HIGGINS, L. D.; CONROY, M.J.; HOUNSLOW, A. M.; JERALA, R.; CRAVEN, C. J.; WALTHO, J. P. Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. **EMBO. J.**, v. 20(17), p. 4774-81, 2001.

STEMMER, W. P. C. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. **Nature**, v. 370, p. 389-391, 1994.

STORER, A. C.; MÉNARD, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods Enzymol**, v. 244, p. 486-500, 1994.

STUBBS, M.T.; LABER, B.; BODE, W.; HUBER, R.; JERALA, R.; LENARCIC, B.; TURK, V. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. **EMBO. J.**, v. 9(6), p. 1939-47, 1990.

TERWILLIGER, T. C. Structural genomics in North America. **Nat. Struct. Biol.**, v. 7, p. 935-9, 2000.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Lett.**, v. 285(2), p. 213-9, 1991.

TURK, V.; STOKA, V.; TURK, D. Cystatins biochemical and structural properties relevance. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 5406-20, 2008.

VAIN, P.; WORLAND, B.; CLARKE, M. C.; RICHARD, G.; BEAVIS, M.; LIU, H.; KHOLI, A.; LEECH, M.; SNAPE, J.; CHRISTOU, P.; ATKINSON, H. J. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-IDD86) for nematode resistance in transgenic plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 266–271, 1998.

VASILJEVA, O.; REINHECKEL, T.; PETERS, C.; TURK, D.; TURK, V.; TURK, B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and potential as drug targets. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, p. 387-403, 2007.

VRIEND, G.; SANDER, C. Quality-control of protein models - directional atomic contact analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 47-60, Part 1, 1993.

WAHLBOM, M.; WANG, X.; LINDSTRÖM, V.; CARLEMALM, E.; JASKOLSKI, M.; GRUBB, A. Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping. **J. Biol. Chem.**, v. 282(25), p. 18318-26, 2007.

WALSH, I.; BAÙ, D.; MARTIN, A. J.; MOONEY, C.; VULLO, A.; POLLASTRI, G. Ab initio and template-based prediction of multi-class distance maps by two-dimensional recursive neural networks. **BMC. Struct. Biol.**, v. 9, p. 5, 2009.

WALKER, A. J.; URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J.; BRAIN, P.; GLEN, D. M.; SHEWRY, P. R. Transgenic Arabidopsis leaf tissue expressing a modified oryzacystatin shows resistance to the field slug *Deroceras reticulatum* (Muller). **Transgenic Research**, v. 8, p. 95–103, 1999.

WU, S.; SKOLNICK, J.; ZHANG, Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. **BMC. Biol.**, v. 5, p. 17, 2007.

XING, R.; WU, F.; MASON, R. W. Control of breast tumor cell growth using a targeted cysteine peptidase inhibitor. **Cancer Res.**, v. 58(5), p. 904-9. 1998.

XIONG, A. S.; PENG, R. H.; LIU, J. G.; ZHUANG, J.; QIAO, Y. S.; XU, F.; CAI, B.; ZHANG, Z.; CHEN, J. M.; YAO, Q. H. High efficiency and throughput system in directed evolution in vitro of reporter gene. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v 74(1), p. 160-8, 2007.

ZAJC, I.; SEVER, N.; BERVAR, A.; LAH, T. T. Expression of cysteine peptidase cathepsin L and its inhibitors stefins A and B in relation to tumorigenicity of breast cancer cell lines. **Cancer Lett.**, v. 187(1-2), p. 185-90, 2002.

ZAJC, I.; FRANGES, L.; LAH, T. T. Expression of cathepsin B is related to tumorigenicity of breast cancer cell lines. **Radiol. Oncol.**, v.37(4), p. 233-240, 2003.

Capítulo II

**Purificação e caracterização de uma
cisteíno peptidase do trato digestivo de
*Sphenophorus levis***

RESUMO

No presente trabalho foi realizado um estudo de purificação e caracterização de uma cisteíno peptidase presente no trato digestivo de larvas do coleóptero *Sphenophorus levis*, uma importante praga da cana de açúcar. A purificação da enzima presente no trato digestivo de *S. levis* foi feita por cromatografia de troca iônica resultando em três picos de eluição com atividade proteolítica. Além disso, experimentos de espectrometria de massa foram realizados, após digestão com tripsina e três peptídeos foram obtidos. A comparação com seqüências de “ESTs” derivadas de uma biblioteca de cDNA do genoma de *S. levis* construída em nosso laboratório revelou que esses peptídeos correspondiam a uma cisteíno peptidase do tipo catepsina L. Estudos cinéticos da enzima com substratos fluorescentes permitiram a caracterização desta e demonstraram a especificidade da enzima para os substratos Z-Phe-Arg-MCA e Z-Leu-Arg_MCA com valor de k_{cat}/K_m de 20 e 30 μM , respectivamente. O perfil de uma enzima do tipo cisteíno peptidase pode também ser sugerido devido à inibição de sua atividade com a adição de um inibidor sintético como o E-64 e por inibidores recombinantes específicos de cisteíno peptidases isolados da cana-de-açúcar: CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 e do arroz: OC-1, os quais revelaram atividade inibitória contra a enzima com valores de constante de inibição (K_i) de 0,59, 0,36, 0,57 e 0,02 e 0,47 nM, respectivamente). Esses estudos representaram a caracterização de uma cisteíno peptidase do trato digestivo de *S. levis* e podem contribuir para a compreensão da interação das cisteíno peptidases de *S. levis* com inibidores isolados a partir de cana-de-açúcar. Além disso, esses dados podem sugerir o uso potencial desses inibidores para a produção de uma cana-de-açúcar transgênica resistente ao ataque desse inseto.

ABSTRACT

In this study we present the purification and characterization of a cysteine peptidase from larvae midgut of coleopterous *Sphenophorus levis*, a important pest of sugarcane. The purification of the midgut enzymes from *S. levis* was accomplished through ionic exchange chromatography which presented three elution peaks of proteins with proteolytic activity. Moreover, the mass spectrometry experiments were performed after digestion with trypsin and three peptides were obtained. The comparison with ESTs sequences from a cDNA library of *S. levis* genome constructed in our laboratory showed that these peptides corresponded to a cysteine peptidase. Kinetic studies of the enzyme with fluorescent substrates allowed the characterization of this and demonstrated the specificity of the enzyme for the substrates Z-Phe-Arg-MCA and Z-Leu-Arg_MCA with of K_{cat} / K_m values of 20 and 30 μM , respectively. Kinetic studies with fluorescent substrates allowed the enzyme characterization, and demonstrated the specificity of enzyme to the substrates Z-Phe-Arg-MCA and Z-Leu-Arg_MCA with k_{cat}/K_m values of 20 and 30 μM , respectively. Inhibitory activity assays revealed the behavior enzyme as a cysteine peptidase due to the inhibition by the E-64 and specific inhibitors of cysteine peptidase isolated from sugarcane: CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3 and CaneCPI-4 and rice: OC-1 which revealed the inhibitory activity against the enzyme ($K_i = 0.59, 0.36, 0.57, 0.02$ and 0.47 nM, respectively). These studies represent the characterization of a midgut cysteine peptidase from *S. levis*, and may contribute to understating of the interaction between cysteine peptidases from *S. levis* and inhibitors isolated from sugarcane. Furthermore, these data may suggest the potential use of these inhibitors for the production of transgenic sugarcane resistant to attack of this insect.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cana-de-açúcar e sua importância para a economia do Brasil

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) é uma gramínea (Poaceae) da ordem Cypilares originária do sudeste asiático, da grande região central da nova Guiné e Indonésia (Daniles & Roach, 1987).

É uma planta que se propaga vegetativamente nas culturas agrícolas por meio de toletes que contêm de três a cinco gemas e, uma vez colocados no sulco de plantio, sofrem indução para brotação das gemas para formação do sistema radicular. A cana-de-açúcar é uma planta ereta, perene, rizomatosa que forma touceiras e pode crescer de três a seis metros. Possui colmo cilíndrico, extremamente glabro, de coloração variável e internamente com feixes vasculares totalmente primários e amplamente diversos. Possui ainda entrenós retos ou em zigue-zague de comprimento, espessura e formas variadas. Podem estar ou não revestidas de uma camada cerosa. Os nós apresentam-se protuberantes ou constrictos. As folhas são simples, alternadas e estreito-lanceoladas. Os frutos são secos do tipo cariópse e com semente de endosperma abundante (Lima *et al*, 2001).

No Brasil, a cana-de-açúcar passou a ser cultivada em larga escala no início do século XVI e se tornou um produto importante para o mercado mundial. Inicialmente, as regiões produtoras de cana-de-açúcar concentravam-se no Nordeste do país, ao redor da Bahia e Pernambuco e, mais tarde, se expandiram para a região sudeste, principalmente no Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais.

A cana-de-açúcar é de grande importância nas indústrias de açúcar e álcool e constitui a base da produção de matérias primas como o bagaço, o melaço, entre outros produtos de utilização crescente (Stupiello, 1987). Devido às condições climáticas

favoráveis, no Brasil foram formados grandes latifúndios monocultores que fundamentam a economia regional até os dias atuais, sendo uma cultura de grande relevância econômica em muitos países tropicais e subtropicais (Stupiello, 1987).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia, Tailândia e Austrália, e o único país no mundo a produzir, a partir dela, em larga escala um combustível renovável, alternativo e pouco poluente como o álcool, em substituição ao petróleo. Além disso, os avanços tecnológicos comerciais possibilitaram o uso do bagaço para a obtenção de energia elétrica. É possível gerar 100 kilowatts de eletricidade por tonelada de bagaço, sendo que a utilização da palha elevaria este potencial e, conseqüentemente, aumentaria ainda mais a importância econômica dessa planta (Saciloto, 2003).

A cana-de-açúcar ocupa cerca de 7 milhões de hectares ou cerca de 2% de toda a terra arável do país. Com uma safra estimada em 500 milhões de toneladas em 2008-2009, o mercado sucroalcooleiro movimenta cerca de 12,7 bilhões de reais por ano com a venda de produtos como o açúcar, aguardente, álcool e alguns subprodutos como melação e a vinhaça. Segundo o cadastro do Departamento da Cana-de-Açúcar e Agroenergia do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), datado de 1/06/2007, existem cerca de 370 unidades produtoras de açúcar e álcool no Brasil, destas 172 estão localizadas no estado de São Paulo.

De acordo com dados da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (Unica) o Centro Sul do País na safra de 2008/ 2009 processou 499,6 milhões de toneladas de cana. A produção de açúcar até este período atingiu o volume de 26,75 milhões de toneladas, 2,11% superior à produção da safra anterior. Estimativas divulgadas pela consultoria Datagro revelam que a moagem correspondente aos períodos de 2009-2010 terá 32,4 milhões de toneladas extras, ou 5,72% acima da safra anterior. Por essas

estimativas o Centro-Sul deverá moer 530 milhões de toneladas de cana nesta safra, com alta de 6,08% sobre a safra de 2008/2009.

Uma vez que a cana-de-açúcar constitui um mercado de grande expressão econômica, as preocupações com a qualidade e a produtividade são constantes neste setor. A qualidade e a produtividade da cana-de-açúcar dependem de fatores como preparo do solo, adubação, escolha de variedades, plantio e ataque de pragas e doenças. Dentre estes fatores estima-se que as perdas na produção causadas por ataques de pragas na cana-de-açúcar chegam a um total de 470 milhões de dólares por ano (Bento, 1999).

1.2. Pragas da cana-de-açúcar

Os insetos fitófagos não são só responsáveis por perdas diretas na produção resultantes de herbivoria, mas também por perdas indiretas, pois podem agir como vetores de patógenos tais como fungos, bactérias e vírus. Lepdóptera, Coleóptera e Hemíptera constituem as três maiores ordens de insetos-praga da agricultura (Gatehouse, 1992). As perdas na produção agrícola mundial causadas por insetos chegam a 37% e sabe-se que mais de 200 doenças de plantas são transmitidas por fitopatógenos (Haq *et al*, 2004). Dados das estimativas das perdas causadas por ácaros e insetos fitófagos na agricultura brasileira chegam a 7,3 % nas grandes culturas tais como algodão, arroz e café; 6,7 % em frutíferas como abacaxi, banana e maçã, por exemplo; e 5 % nas culturas olerícolas que incluem alho, batata e tomate, entre outras (Bento, 1999). Os gastos com inseticidas como método de controle chegam a 15% do total da produção representando US\$ 100 bilhões (Krattiger, 1997) e o custo anual para o controle de insetos-praga chega a US\$ 8 bilhões.

O inseto conhecido como “Gorgulhão rajado” ou “bicudo da cana”, de nome científico *Sphenophorus levis*, infecta as lavouras de cana-de-açúcar e vem causando

grandes prejuízos para a agricultura do país. O foco inicial do inseto ocorreu no município de Santa Bárbara do Oeste - São Paulo em 1977. Atualmente, o *S. levis* encontra-se distribuído em mais de 40 municípios, incluindo as regiões Central (Araraquara, São Carlos, Jaú, etc); Sul (Assis, Ourinhos); Nordeste (Pradópolis) e Leste (Leme, Pirassununga, Araras, São João da Boa Vista, Santa Cruz das Palmeiras, etc.) de São Paulo, estando, portanto, em quase todas as regiões de cultivos de cana-de-açúcar do estado (Leite *et al*, 2005).

As perdas na produção chegam a 30 toneladas de cana-de-açúcar em peso/ha/ano, além de reduzirem a longevidade do canavial. O dano é causado pelas larvas que atacam a parte basal das plantas, o rizoma, devido à construção de galerias no colmo à medida que se desenvolvem levando a morte das touceiras (Degaspari *et al*, 1987).

O inseto do gênero *Sphenophorus* é um coleóptero da família curculionidae identificado em 1978 (Vanin *et al*, 1988) e que ocorre em diversos países, de vários continentes, abrangendo um complexo de espécies que danificam culturas de importância econômica do grupo das gramíneas. Somente nos EUA ocorrem mais de 64 espécies desse gênero, sendo que 20 já foram registradas na Flórida. É comumente encontrado na América do Sul com 14 espécies descritas no Brasil (Leite *et al*, 2005).

A importância do *S. levis* como praga da cana-de-açúcar no Brasil somente foi conhecida a partir de 1978, sendo que em 1989 o inseto foi detectado em 14 municípios ao redor de Piracicaba causando a morte de 50-60% dos perfilhos, ainda na fase de cana-planta, com cinco a sete meses de crescimento (Leite *et al*, 2005).

O *S. levis* mede cerca de 15 mm, possui hábitos noturnos, é pouco ágil e simula-se morto quando atacado. As fêmeas inserem os ovos na base de brotações, abaixo do nível do solo, após perfurarem os tecidos sadios do rizoma com as mandíbulas presentes

no ápice do rostro ou bico. Após 7 a 12 dias de incubação dos ovos, as larvas eclodem e passam a escavar galerias no interior e na base da planta ao se alimentarem, as quais permanecem cheias de serragem. As larvas recém-nascidas são brancas e com cabeça e corpo volumoso (Figura 1). Elas penetram no rizoma em busca de alimento e abrigo construindo galerias irregulares (Figura 2 A e B) onde permanecem até o estágio adulto, bloqueando a parte basal da planta e rizomas, causando, como consequência, o amarelamento do canaviais (Figura 2- C), morte das plantas e falhas nas brotações das soqueiras (Cerdeira *et al*, 1999).



Figura 1: *Sphenophorus levis*. Fotografia mostrando os três estágios de desenvolvimento do inseto. As setas amarelas indicam a presença de duas larvas, uma pupa e dois adultos. Fonte: Ribeiro, 2007.

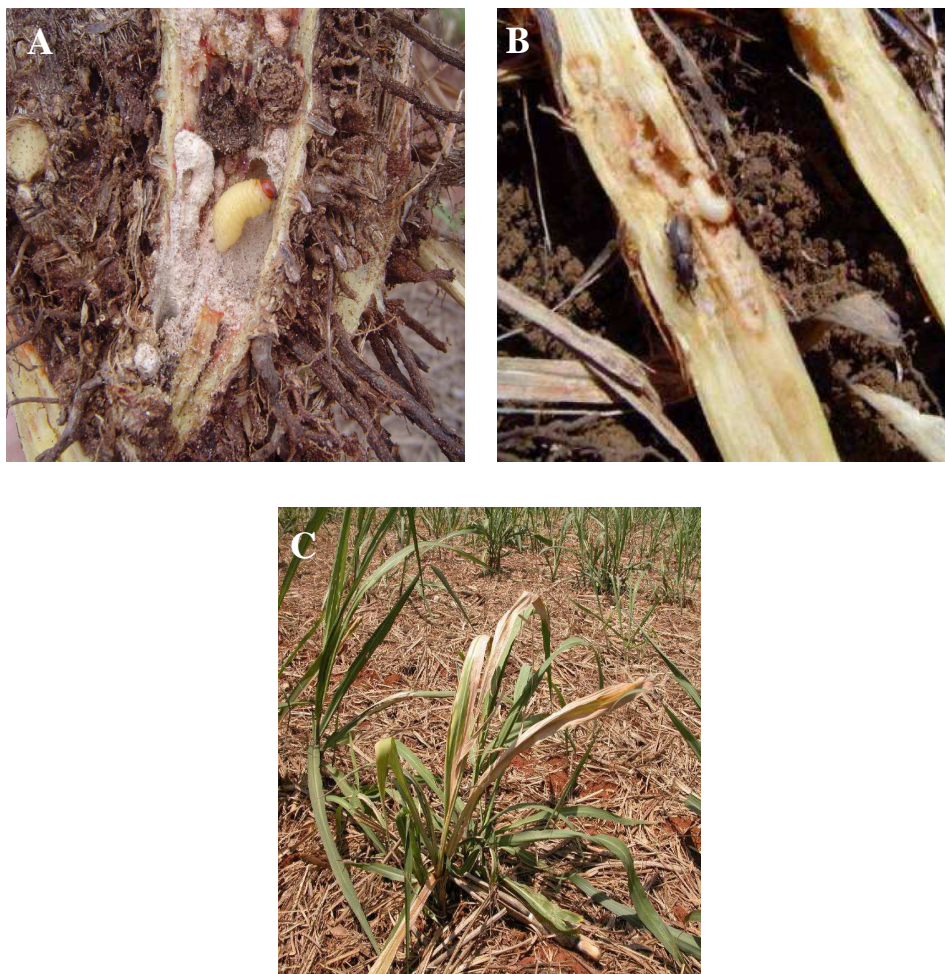


Figura 2: Danos causados pelo ataque do *Sphenophorus levis*. Em A: dano causado no rizoma da planta; Em B: dano causado no colmo; Em C: amarelamento das touceras. Fonte: disponível em <www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/Workshop_Pragas_sessao4_Mauricio.pdf-acesso em março de 2009).

Segundo Degaspari e colaboradores (1987), o ciclo biológico da espécie em condições de laboratório (de 27 a 30 °C e fotofase de 12 horas) varia de 58 a 307 dias, sendo a média de 173, 2 dias. As fêmeas colocam seus ovos na base das brotações ou ao nível do solo. Os ovos são de forma elíptica com comprimento médio de 0,27 mm e 0,10 mm de largura com coloração branca leitosa e, logo após a postura e à medida que se aproximam da eclosão, os ovos começam a exibir uma coloração escurecida. O período de incubação é de 7 a 12 dias.

A larva quando recém eclodida também apresenta coloração branco leitosa, mas com o desenvolvimento adquire cor em tom amarelado. A cabeça é avermelhada e as

mandíbulas são bem desenvolvidas. Uma mancha de cor castanho escura está presente sobre o dorso e no primeiro segmento torácico (junto à cabeça) e os espiráculos são visíveis no abdome. O desenvolvimento na fase larval pode durar entre 30 - 60 dias (Precetti & Arrigoni, 1990).

A pupa apresenta coloração branca leitosa logo após a eclosão e torna-se um tom castanho à medida que se aproxima a emergência do adulto. Encontra-se envolvida dentro de um casulo friável feito com serragem fina. Em condições de laboratório, o período na fase de pupa pode ter duração de 5-13 dias (Degaspari *et al*, 1987).

O adulto é de hábito noturno, tem pouca agilidade e simula-se morto quando atacado. O inseto tem atratividade por solos claros, argilosos e com boa umidade (Pinto *et al*, 2006). São freqüentemente encontrados abaixo do nível do solo, possuem coloração castanho escura com manchas pretas no dorso do tórax e listras longitudinais sobre os élitros. A longevidade média dos adultos é de 203 dias para os machos e 224 dias para as fêmeas, sendo que cada fêmea coloca ao longo desse período 40 ovos, podendo chegar a 60 – 70 ovos. O bicudo da cana tem uma capacidade de vôo restrita, sugerindo que a dispersão do inseto a longas distâncias dá-se através das mudas retiradas do local infestado. Os adultos caminham lentamente possibilitando a sua dispersão de um talhão para outro vizinho (Dinardo-Miranda, 2005).

Existem poucas informações disponíveis sobre hospedeiros alternativos da espécie. Sendo que, existe a citação de exemplares em bromeliáceas (Vaurie, 1978) e em algumas ervas daninhas como a grama seda (*Cynodon dactylon* L.), o capim colchão (*Digitaria horizontalis* Willd), o capim marmelo (*Brachiaria plantaginea* L.) e o capim colonial (*Panicum Maximum* Jacq), que podem favorecer a presença do inseto por oferecerem abrigo aos adultos.

Para o controle dessa praga é recomendado um conjunto de medidas que consiste na destruição mecânica da soqueira na época apropriada; o uso de iscas tóxicas; a manutenção da área destruída livre de vegetação hospedeira por um período prolongado (> 3 meses); e o plantio com aplicação de fipronil 800 WG (250 g/ha). Entretanto, apesar de todas essas medidas, ainda é constatado um incremento nas populações dessa praga, sendo freqüente, nos últimos anos, registros de novas áreas infestadas (Leite *et al*, 2005).

O comportamento do *S. levis* em estágio larval não permite a utilização de inseticidas sintéticos porque eles permanecem no interior da cana. Alguns inseticidas vêm sendo utilizados no controle desta praga, mas sem sucesso. O controle químico, entretanto, traz consigo efeitos prejudiciais em longo prazo, como a contaminação do meio ambiente e a eliminação de parasitóides e predadores, que são agentes de controle biológico de pragas. Além disso, centenas de espécies de insetos desenvolvem resistência a um ou mais inseticidas devido ao processo de pressão seletiva.

Sendo assim, novas estratégias para o controle do inseto podem ser aplicadas como uma abordagem útil no manejo integrado desta praga. Uma possível solução para este problema seria a utilização de plantas transgênicas expressando proteínas de resistência que poderiam contribuir de maneira significativa para a diminuição das perdas na agricultura causadas por estes e outros insetos. A utilização de inibidores de cisteíno peptidases pode ser uma alternativa útil como método de controle de insetos. Como as peptidases digestivas dos insetos catalisam a liberação de peptídeos e aminoácidos essenciais para o seu desenvolvimento, as cistatinas poderiam atuar diretamente nas peptidases do intestino do inseto interferindo na digestão de proteínas essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento.

1.3. Peptidases digestivas de insetos

A classe insecta é composta por um grupo diverso de animais com mais de um milhão de espécies, que inclui mais da metade das espécies existentes em todo o mundo (Gallo *et al*, 2002). Considerando todos os animais existentes na terra, aproximadamente 67% são insetos (Buzzi & Miyazaki, 1999).

Um dos motivos para esse sucesso evolutivo é devido à habilidade em explorar os mais diversos tipos de materiais orgânicos como fonte de alimentos, sejam eles de origem animal ou vegetal (Terra *et al.*, 1996a). Os nutrientes necessários para o desenvolvimento adequado dos insetos podem provir do alimento ou de outras fontes, como tecidos de reserva, microrganismos simbiotes ou da síntese do próprio inseto (vitaminas) (Buzzi & Miyazaki, 1999). A digestão é um processo em que o alimento em sua forma ingerida é degradado em componentes assimiláveis. A capacidade digestiva dos insetos depende das enzimas presentes em seu trato digestivo e como elas estão compartimentalizadas (Terra *et al*, 1996b). A diversidade de fontes de alimentos dos insetos resultou em profundas modificações enzimáticas em determinadas espécies. As enzimas que efetuam a digestão dos alimentos exibem uma diversidade correspondente e variam com a natureza das mesmas (Murdock & Shade, 2002).

O processo digestivo ocorre por meio da ação de enzimas digestivas secretadas pelo intestino médio e glândulas salivares (Buzzi & Miyazaki, 1999). O tubo digestivo em insetos é dividido em três regiões: intestino anterior (estomodeu), intestino médio (mesêntero) e intestino posterior (proctodeu) (Chapman, 1998) (Figura 4). De maneira geral, pode-se descrever que no intestino anterior localiza-se o estômago que age como um órgão de armazenamento. O intestino médio é o principal órgão de digestão e absorção de nutrientes e o intestino posterior e os túbulos de Malpighi são os órgãos de reabsorção e excreção respectivamente (Terra, 1998).

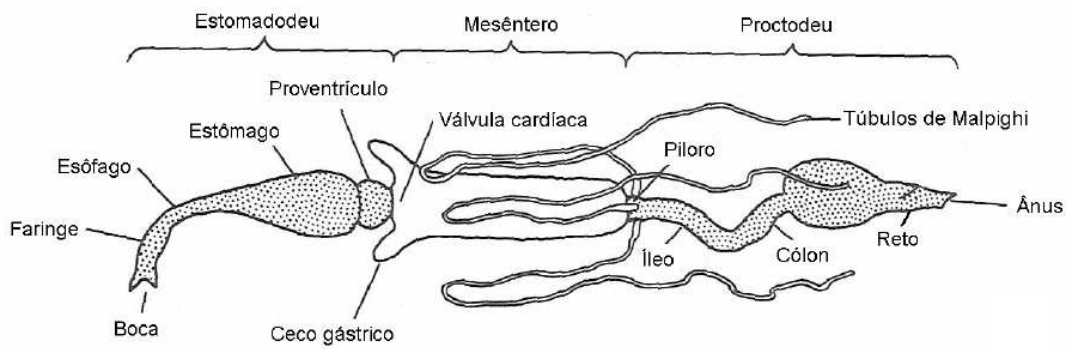


Figura 3: Visão geral do trato digestivo e excretório de insetos. Fonte: Daly, *et.al.* 1998.

Padrões complexos de enzimas digestivas presentes no intestino médio dos insetos e a composição desse complexo enzimático é diferenciada entre as ordens dos insetos (Terra, 1998). As peptidases digestivas possuem participação em dois papéis que são críticos na fisiologia do inseto: a) na quebra de proteínas em aminoácidos essenciais para o crescimento e desenvolvimento do mesmo; e b) na inativação de proteínas tóxicas ingeridas, como consequência da alimentação (Terra, 1998). O rompimento desses processos tem o potencial de suprimir as populações de insetos fitófagos devido à limitação da disponibilidade de nutrientes ou pelo aumento da vulnerabilidade às proteínas tóxicas.

Na tentativa de controle do ataque de insetos dos cultivares, têm se buscado novos métodos que não sejam baseados na utilização de agroquímicos. O intestino do inseto, particularmente o intestino médio, é um órgão reconhecido como um ponto em potencial ao ataque para o controle de populações de insetos e, ou, no controle da transmissão de doenças.

1.4. Cisteíno peptidases em insetos

Conforme já descrito no *Capítulo I* (seção 1.1 página 5), as peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de outras proteínas. De acordo com a posição da ligação peptídica clivada, as enzimas proteolíticas podem ser classificadas como endo ou exopeptidases. As endopeptidases quebram ligações peptídicas nas regiões internas da proteína, enquanto as exopeptidases agem nos extremos da cadeia protéica, seja na porção amino (N) ou carboxi (C)-terminal. Atualmente, são reconhecidas seis classes de enzimas proteolíticas: proteases aspárticas, proteases glutâmicas, metaloproteinasas, proteases cisteínicas, proteases serínicas e proteases treonínicas. De acordo com o modelo de nomenclatura quanto à especificidade das cisteíno peptidases desenvolvido por Schechter & Berger (1967), os subsítios da enzima, designados pela letra “S”, flanqueiam o sítio catalítico da enzima e são locais de ligação da enzima ao substrato. Cada subsítio é capaz de acomodar um único resíduo de aminoácido do substrato. Os aminoácidos dos peptídeos que os subsítios acomodam são designados pela letra “P” (*Capítulo I*, Figura 1, seção 1.1, página 8).

As cisteíno peptidases (também já descritas no *Capítulo 1*, seção 1.2, página 8) são compostas por 10 clãs e divididas em 72 famílias. Sendo que, a peptidase representante da família C1 é a papaína extraída da *Carica papaya*. Cisteíno peptidases da família C1 são endopeptidases em sua maioria e requerem um ambiente redutor levemente ácido (com um intervalo de pH entre 3,0 e 6,5) para a sua atividade ótima. A especificidade do substrato é determinada pela região S2 da enzima que é preferencialmente ocupada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Ménard *et al*, 1993; Storer & Ménard, 1993).

Muitas cisteíno peptidases são sintetizadas como precursores que contêm um pró-domínio ativo. A pró-região encontra-se envolvida em diversas funções, entre elas a

regulação da atividade enzimática (Sajide & Mackerrow 2002; Wiederanders *et al*, 2003). As cisteíno peptidases possuem uma grande diversidade funcional, como adaptabilidade e a diferentes substratos e estabilidade em diversos ambientes biológicos. As propriedades físico-químicas destas peptidases têm sido amplamente caracterizadas, embora para muitas as funções biológicas ainda não tenham sido completamente elucidadas.

Diversos trabalhos têm confirmado que estas enzimas são importantes para o processo de digestão dos insetos. No caso dos coleópteros, as cisteíno peptidases são as enzimas digestivas predominantes (Murdock *et al*, 1987; Lawrence *et al*, 2002).

Girard e colaboradores (1998a) caracterizaram e identificaram cisteíno e serino peptidases presentes em larvas de *Psylliodes chrysocephala* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). Os ensaios de atividade proteolítica foram realizados em condições de diferentes valores de pH utilizando a azocaseína como substrato. Nos resultados, os autores puderam observar dois picos de atividade, um entre os pHs 6,0 e 6,5 e outro em valor de pH 10, o que sugeriu a presença de cisteíno e serino peptidases, respectivamente. Os ensaios de inibição em gel de atividade em pH 6,0 resultaram na completa inibição por E64 e Orizacistatina I (inibidores específicos de cisteíno peptidases), confirmando a presença de cisteíno peptidases. Porém, as bandas detectadas ativas em pH 10 foram parcialmente sensíveis ao inibidor PMSF (específico para serino peptidases), sendo que apenas uma das quatro bandas testadas apresentou inibição completa. Ainda assim, devido às evidências encontradas, os autores sugeriram que as outras bandas restantes eram, provavelmente, referentes à serino peptidases, uma vez que o ensaio foi realizado em pH muito alcalino.

Em outro trabalho, Girard e colaboradores (1998b) desenvolveram um estudo detalhado das proteinases digestivas de *Phaedon cochleariae* (Coleoptera:

Chrysomelidae). Os autores demonstraram que a larva desse inseto liberava um complexo de enzimas proteolíticas envolvendo endopeptidases e exopeptidases para a digestão protéica. Quatro cisteíno peptidases e duas serino peptidases foram detectadas em ensaios de gel de atividade. Além disso, também foram encontradas aspartil proteinases e leucina aminopeptidases. Essa diversidade de proteinases digestivas na larva forneceu indícios da digestão de uma variedade de extratos protéicos e a adaptação a diferentes dietas. Ensaios de interações entre as proteinases digestivas e as proteinases inibidoras OC-1 (orizacistaina 1) e BBI (“Bowman Birk Inhibitor”) na dieta das larvas revelaram que ambos os inibidores foram clivados rapidamente, e conseqüentemente resultando na perda da capacidade inibitória, que demonstrou a existência de um mecanismo de resistência muito eficiente neste coleóptero.

Outro exemplo é o estudo com o coleóptero Cowpea Weenil (*C. maculatus*), em que foi possível a identificação de enzimas da classe das cisteíno peptidases no intestino destas larvas (Campos *et al*, 1989). Proteases similares também foram isoladas de intestino de larvas do besouro da flor *Tribolium castanatum* (Murdock *et al*, 1987).

De Oliveira-Neto e colaboradores (2004) isolaram o cDNA (*AgcysI*) correspondente a uma cisteíno peptidase do intestino da larva de *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), inseto-praga do algodão. Nesse estudo, os autores demonstraram que *AgcysI* é uma cisteíno peptidase importante para o processo digestivo da larva. Outras cinco cisteíno peptidases foram isoladas de uma biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor*, e identificadas como sendo do tipo catepsina L por Cristofolletti e colaboradores (2005). Estudos têm demonstrado que enzimas de inseto do tipo catepsinas L podem ser importantes para processo de digestão e parecem estar envolvidas em mecanismos de resistência contra inibidores naturais e plantas transgênicas (Hilder & Boulter, 1999).

As cisteíno peptidases isoladas do intestino de insetos podem ter sua atividade inibida por inibidores sintéticos e por inibidores naturais. Murdock e colaboradores (1987) em um estudo com peptidases do intestino de vários membros da ordem coleóptera constataram que 10 de 11 besouros tiveram inibição de peptidases por um reagente à base de sulfidril (PCMBs), indicando que as proteases eram da classe das cisteíno peptidases. Sendo que, a atividade ótima observada nas cisteíno peptidases ocorreu em pH 5-7, que é a mesma faixa de pH do intestino de insetos que utilizam cisteíno peptidases na digestão (Murdock *et al*, 1987).

O uso de genes codificando proteínas inibidoras de peptidases para criar plantas transformadas resistentes a insetos-praga tem sido frequentemente demonstrado na literatura (Hilder *et al*, 1987; Gatehouse *et al*, 1992;; McManus *et al*, 1994; Leplé *et al*, 1995; Duan *et al*, 1996). Os inibidores de peptidases se ligam especificamente em proteínases alvo no intestino e, portanto, podem inibir a habilidade do inseto para a digestão de proteínas resultando na diminuição do crescimento e morte do patógeno (Broadway & Duffey, 1986). Os diversos papéis das peptidases nesses organismos e os mecanismos bioquímicos afetados pela interação com inibidores podem ser diferentes, mas a sua importância para o crescimento e desenvolvimento de forma anormal é evidente.

A transformação de plantas com inibidores de peptidases parece ser uma abordagem atrativa para o controle de pragas de vegetais e agentes patogênicos de diversas plantas de importância econômica. O uso do inibidor orizacistatina I, isolado do arroz (Abe *et al*, 1987), tem demonstrado inibir proteínases e/ou afetar o crescimento de diversas espécies de Coleópteras (Liang *et al*, 1991; Chen *et al*, 1992; Benchekroun *et al*, 1995; Siqueira-Junior *et al*, 2002).

Uma vez que, as enzimas digestivas proteolíticas são responsáveis pelo processo de digestão protéica e, conseqüentemente, pelo suprimento de aminoácidos necessários para o desenvolvimento, o conhecimento da atividade dessas enzimas e a sensibilidade a inibidores são fundamentais para futuros programas de controle de pestes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar uma cisteíno peptidase do trato digestivo de *S. levis* (Coleóptera: Curculionidae), uma praga da cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos Específicos

- Extração e purificação de uma cisteíno peptidase do trato digestivo de *S. levis*;
- Estudos de espectrometria de massa com a enzima por meio de digestão com tripsina;
- Ensaios de caracterização enzimática pela determinação dos parâmetros cinéticos da enzima.
- Atividade da cisteíno peptidase de *S. levis* em diferentes condições de pH e concentrações de NaCl.
- Ensaios de inibição da atividade enzimática com diferentes inibidores de cisteíno peptidases (cistatinas) recombinantes da cana-de-açúcar (CaneCPI-1, 2, 3 e 4) e do arroz (OC-1), além dos inibidores sintéticos E64 (Calbiochen), (específico para cisteíno peptidase) e CA074 (Calbiochen), (específico para catepsina lisossomal B).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Purificação de uma cisteíno peptidase do trato digestivo de *Sphenophorus levis*

3.1.1. Obtenção das larvas de *Sphenophorus levis*

As larvas de *S. levis* utilizadas para a extração da proteinase foram cultivadas no Laboratório de Entomologia do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira - Piracicaba-SP) e cedidas gentilmente pelo Dr. Luiz Carlos Almeida. As larvas foram mantidas em dieta artificial até atingir a idade de 25 dias sendo que as condições de cultivo das larvas foram feitas de acordo com Degaspari *et al*, 1987.

3.1.2. Extração e Purificação da cisteíno peptidase das larvas de *Sphenophorus levis*

Dez larvas de *S. levis* foram mantidas a 4 °C durante 5 minutos, dissecadas e homogeneizadas em tampão contendo Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM e Triton X-100 2 %, pH 7.4 . A mistura foi centrifugada a 6000 g durante 30 min. A fração solúvel foi aplicada em uma coluna DEAE-Sephadex (25 x 2 cm) equilibrada com 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, a um fluxo de 3 ml h⁻¹. As proteínas foram eluídas com 1.0 M NaCl no mesmo tampão. O perfil de eluição da proteína foi monitorado pela leitura da absorbância em U.V a 280 nm. Após a eluição da proteína, foi feita diálise em tampão contendo 10 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl, pH 8.0. Os produtos purificados foram analisados em gel de 15 % poliacrilamida com SDS e a concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). A concentração molar da cisteíno peptidase de *S. levis* foi determinada pela titulação com o inibidor E-64, de acordo com o método descrito por Kirschke e colaboradores (1981).

3.2. Digestão com tripsina da cisteíno peptidase e análise por espectrometria de massa.

Essa etapa dos experimentos foi realizada com a importante colaboração do Prof. Dr. José Cesar Rosa do Centro de Química de Proteínas - Departamento de Biologia Molecular e Celular, da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

A proteína purificada em coluna DEAE-Sepharose foi submetida à digestão por tripsina por 24 horas a 37°C em 0.1 M de bicarbonato de amônio. A hidrólise de tripsina foi interrompida pela adição de 5 µl de ácido fórmico e os peptídeos trípticos foram desaliviados em micro ponteiras contendo resina POROS R2 (Perseptive Biosystem). A resina foi carregada e previamente ativada, em metanol e lavada para a remoção do sal com 150 µl de ácido fórmico 0.2 % por 3 vezes e eluídos em 30 µl de solução contendo ácido fórmico 5 % e metanol 60 %.

As análises de espectrometria de massa de peptídeos trípticos MS foram realizadas em espectrômetro de massa por “eletrospray” triplo quadruplo Quattro II (Micromass, Manchester, UK) por infusão direta (300 nL/min) sob as seguintes condições: voltagem de capilaridade mantida a 2.8 kV, cone de voltagem de 40 V e cone de temperatura a 100 °C. Os parâmetros para varredura de íons MS1 foram otimizados com fragmentos de peptídeos sintéticos ACTH 18-39 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e angiotensina II fornecidos pelo Laboratório de Síntese de Peptídeos da UNIFESP, São Paulo, ambos na concentração de 1 pmol/µl. A fragmentação dos peptídeos foi obtida por CID-MS/MS e a energia de colisão utilizada foi entre 25 e 40 eV e o argônio foi usado como gás de colisão a uma pressão parcial de 3.0×10^{-3} mTorr. Cada espectro foi coletado de 20-50 scans (2 a 5 scan/segundo) e foi processado utilizando o programa MassLynx v.3.3. (Micromass, Manchester, UK) e os íons foram desconvoluídos para massa molecular utilizando o algoritmo MaxEnt1 ou MaxEnt3. A

seqüência de aminoácidos dos peptídeos trípticos foi deduzida a partir das séries de fragmentos de íons b e y produzidas pela colisão induzida pela espectrometria de massa (CID-MS/MS). As razões de massa por carga foram determinadas com o peptídeo sintético precursor de íon angiotensina II, a 150 ppm \pm 20 por ESI-MS. Para fragmentos de íons do tipo y e b as medidas foram a 300 ppm \pm 100 após múltiplas análises por ESI-CID-MS/MS.

A seqüência de aminoácidos dos peptídeos trípticos foram comparadas com a seqüência de aminoácidos da proteína correspondente a uma “EST” obtida a partir do genoma de “ESTs” de *S. levis*, o qual foi seqüenciado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil. Os peptídeos foram, então, comparados em detalhes com a seqüência do clone H07 identificado no “GenBank” com o número de acesso FJ467290.

3.3.- Ensaio de atividade enzimática da cisteíno peptidase purificada de *Sphenophorus levis*

A atividade enzimática da cisteíno peptidase de *S. levis* foi monitorada em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 medindo a fluorescência em comprimentos de onda de λ_{ex} =380nm e λ_{em} =460 nm, baseado no procedimento descrito por Anastasi e colaboradores (2002). Aproximadamente 20 μ M da enzima purificada foi adicionada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5.5, contendo 2.5 mM DTT e incubada durante 3 min a 37 °C. Os substratos fluorescentes Z-Phe-Arg-MCA, Z-Leu-Arg-MCA e Z-Arg-Arg-MCA (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) foram adicionados em diferentes concentrações e a atividade da cisteíno peptidase foi monitorada. A determinação do parâmetro cinético (K_m) foi realizada nas condições descritas acima e foi calculada por regressão não linear utilizando o programa GraFit (Leatherbarrow, 1992). A constante de segunda ordem

k_{cat}/K_m foi determinada sob condições de pseudo de primeira ordem, em que $[S] < K_m$, e calculadas também pela regressão não linear com a utilização do programa GraFit (Leatherbarrow, 1992).

3.4. Atividade da cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis* em diferentes condições de pH e concentrações de NaCl.

As condições de pH ótimo e concentração de NaCl para a atividade da enzima foram determinadas seguindo o procedimento descrito do item 3.3, porém utilizando o Z-Phe-Arg-MCA (0,03 μ M) como substrato. Os tampões utilizados para as medidas de atividade em diferentes pH foram, acetato de sódio 100 mM (pH 4.0 - 5.5); fosfato de sódio 50 mM (pH 6.0- 7.0); Tris-HCl 10 mM (pH 7.5 - 8.5) e borato de sódio 50 mM (pH 9.0 -10.0). Para as condições de NaCl foram testadas as concentrações de 0 (ausência) a 100Mm.

3.5. Inibição da atividade enzimática da cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis*

A inibição da atividade enzimática da cisteíno peptidase de *S. levis* foi determinada baseada no procedimento descrito anteriormente utilizando o substrato fluorescente Z-Phe-Arg-MCA (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 em comprimentos de onda de $\lambda_{ex}=380$ nm e $\lambda_{em}=460$ nm individual residual da cisteíno peptidase de *S. levis* na concentração de 20 nM. A enzima foi adicionada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5.5, contendo 2.5 mM dithiothreitol (DTT, ICN Biomedicals Inc., USA) e incubações subseqüentes foram feitas com os diferentes inibidores de CaneCPI-1 (Soares-Costa *et al.*, 2002), CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4 (Gianotti *et al.*, 2006, Gianotti *et a.*, 2008), e os inibidores sintéticos E-64 e CA074, durante 5 minutos a 37 °C. O substrato Z-Phe-Arg-MCA (0.03

μM) foi, então, adicionado e a atividade residual da cisteíno peptidase foi determinada. A constante de inibição aparente (K_i app) foi calculada segundo o procedimento de Morison utilizando o programa GraFit (Leatherbarrow, 1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação de uma cisteíno peptidase do trato digestivo das larvas de

Sphenophorus levis

A purificação da cisteíno peptidase de *S. levis* foi realizada por cromatografia de troca iônica da cisteíno peptidase de *S. levis* em DEAE-Sepharose. Foi detectado um pico largo correspondente a proteína inativa eluída com 0,3M de NaCl. Além disso, foi verificada a presença de dois picos de eluição na concentração de 1 M NaCl (Figura 4A). As análises em SDS-PAGE 15% revelaram que a purificação foi eficiente como demonstrado pela presença de uma banda única de massa molecular aproximada de 35 kDa em ambas as frações (Figura 4B). Esta informação está de acordo com a massa molecular esperada deduzida a partir do clone de cDNA identificado no projeto genoma do *S. levis* que está sendo realizado em nosso laboratório (“GenBank” com o número de acesso FJ467290), o qual codifica uma cisteíno peptidase.

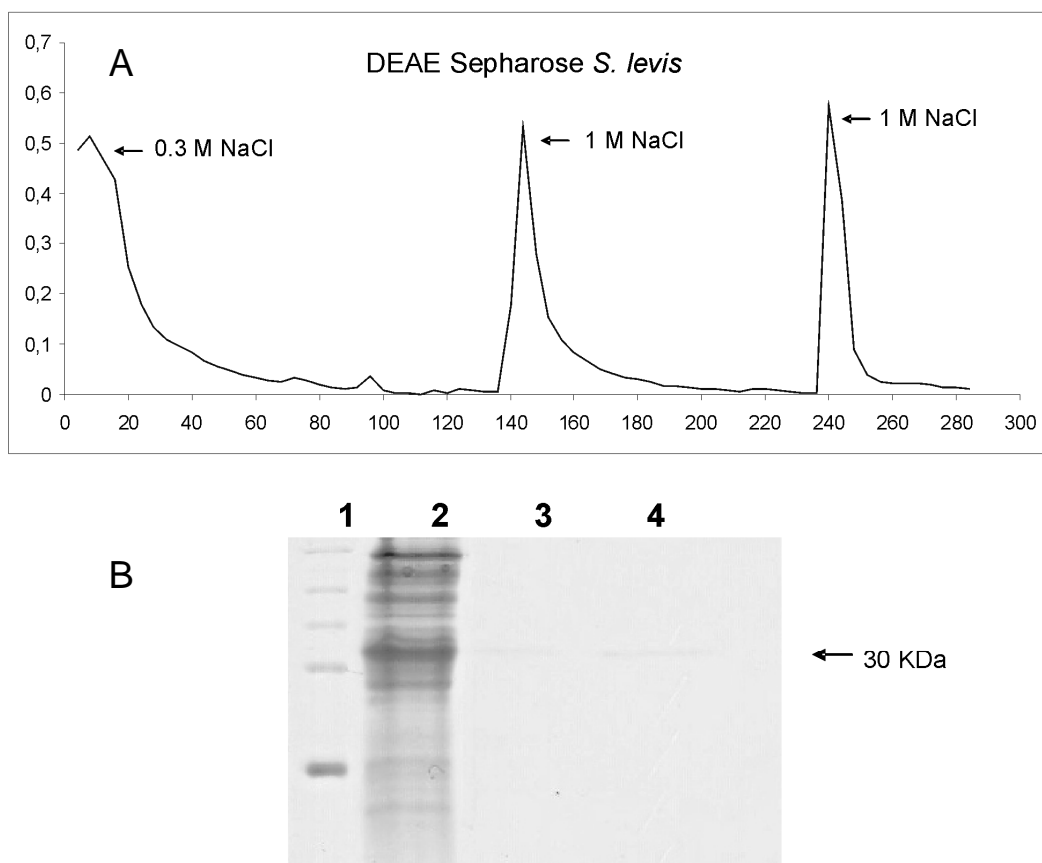


Figura 4: Purificação de uma cisteíno peptidase do trato digestivo de *Sphenophorus levis*. O extrato proteico de *Sphenophorus levis* foi purificado por cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex. 1A: Perfil cromatográfico obtido da purificação da enzima em DEAE Sephadex com eluição em 1 M de NaCl; 1B: SDS-PAGE 15% corado com “comassie blue”. Em 1: Marcador de massa molecular (Invitrogen); 2: extrato de intestino de *Sphenophorus levis*; 3 e 4: fração eluída em 1 M de NaCl (notar a banda de aproximadamente 35 kDa).

4.2. Análises por espectrometria de massa

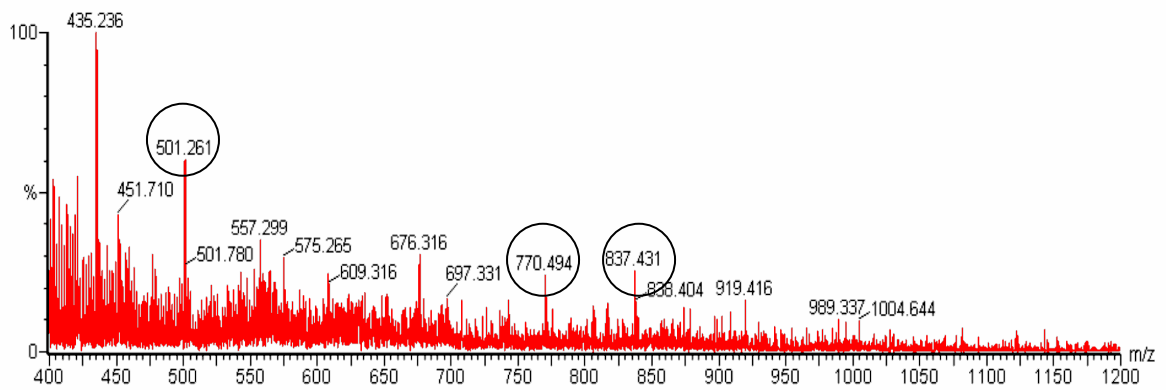
A enzima purificada de *S. levis* foi submetida a digestão por tripsina e os peptídeos foram analisados por espectrometria de massa. Os dados da espectrometria de massa obtidos pelo CID-MS/MS forneceram a informação da seqüência de aminoácidos de três peptídeos: VPESIDWR, NVVTPIK e DYWLIK (Figura 5 e Tabela 1). Os três peptídeos estão presentes na seqüência de uma cisteíno peptidase do tipo catepsina L

que foi deduzida de um clone obtido a partir da biblioteca cDNA de *S. levis*. A comparação com o clone completo FJ467290 está demonstrada na figura 6. Embora as seqüências não sejam idênticas, a soma das massas dos peptídeos está de acordo com a seqüência deduzida a partir do clone e, além disso, existe a possibilidade dos peptídeos coincidirem com outros clones da biblioteca de cDNA *S. levis* que contém isoformas desta enzima. Os dados obtidos com a espectrometria de massa confirmam a identidade da proteína purificada como sendo uma cisteíno peptidase. Além disso, corroboram para futuros estudos utilizando o clone completo da biblioteca de *S. levis*. A fase aberta de leitura contida nesse clone já foi inclusive clonada em vetor de expressão e expressa em *Pichia pastoris*. A proteína já foi purificada e sua atividade está sendo analisada e comparada com a proteína purificada a partir do extrato intestinal da larva. Este trabalho está sendo realizado por um outro aluno de doutorado do laboratório de biologia molecular.

Tabela 1. Seqüência dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos trípticos da proteína de *Sphenophorus levis* obtida por ESI-CID-MS/MS.

m/z	Mr	Seqüência de Aminoácidos							
501.26 ⁺²	1001.52	V	P	E	S	L	D	W	R
770.49 ⁺¹	769.49	N	V	V	T	P	L	K	
837.43 ⁺¹	836.43	D	Y	W	L	L	K		

*observação: Ile/Leu não são discriminados no espectro e estão representados por L.



MPTLYKKVGEENVNKSFILVSLVAVSATLLKEDGAHFQSFKLKHGKTYKNQAEETKRFAIFRENLRKIEAHNAEYKQGI
 HGYTQGINKFADMTRAEFKAMLATQVKTKPSIVATKTFQLADGVS**VPESIDWRSRNVVTPIKD**QAQCGSCWAFVVGSTEG
 AYALSTGKLTRFSEQQLVDCTTDLNYGCDGGYLDLDFPYIQTNLELESYPLHGYDGYCSYESSKVVTKVSSYVSPAEQ
 ALLEAVGTAGPVAIAINADDLQFYFSGIIDDKYCDPEYLDHGVAVGYDSENGR**DYWLIKNSWGADWGESGYFRFLRGQIC**
 GVKEDAVYPLI

Figura 5. Espectro resultante da análise de ESI-CID-MS/MS dos peptídeos trípticos da enzima de *Sphenophus levis*. Os três peptídeos (vermelho) foram encontrados na seqüência da cisteína peptidases deduzidas a partir de um clone de EST da biblioteca de cDNA de *S. levis*. Em círculo, destaca-se os respectivos peptídeos trípticos com os valores da massa molecular teórica apresentados da tabela 1.

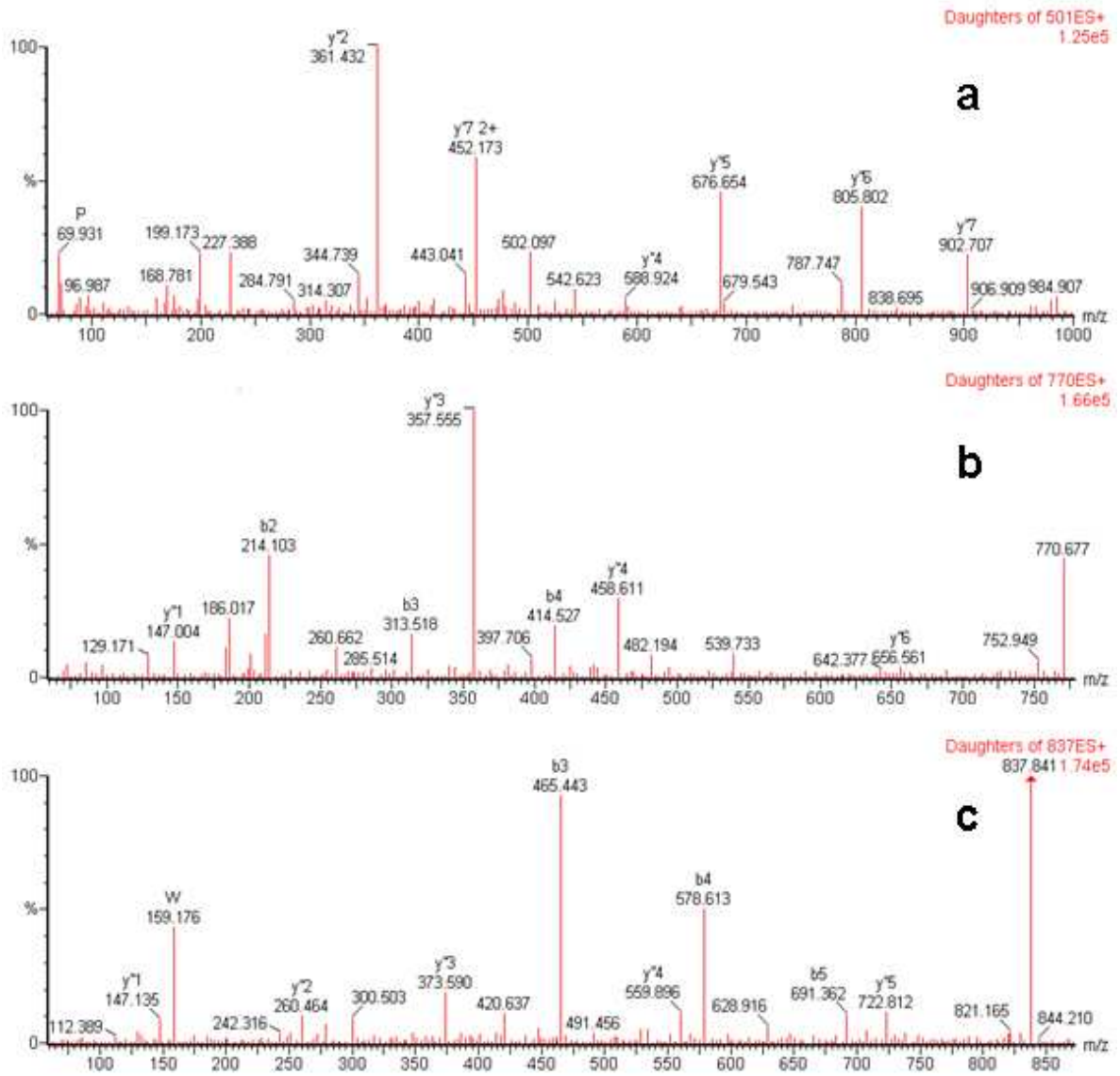


Figura 6: Espectro ESI-CID-MS/MS dos peptídeos resultantes da digestão da enzima isolada do *Sphenophorus levis* com tripsina. As seqüências de aminoácidos foram deduzidas a partir de fragmentos de íons. Em a): espectro referente à seqüência do peptídeo VPESLDWR; em b): espectro referente à seqüência do peptídeo NVVTPLK e em c) espectro referente à seqüência do peptídeo DYWLLK.

4.3. Especificidades de substrato e estudos cinéticos da cisteíno peptidase purificada de *Sphenophorus levis*

A atividade enzimática da cisteíno peptidase purificada de *S. levis* foi monitorada utilizando o substrato fluorescente com estrutura Z-Xaa-Arg-MCA, onde

Z= carbobenzoxi; Xaa= Arginina, Fenilalanina ou Leucina; MCA = 7 amino-4-metilcoumarina).

A tabela 2 mostra que a cisteíno peptidase de *S.levis* tem uma potente ação sobre o Z-Phe-Arg-MCA, um substrato comumente utilizado para ensaios de atividade de enzimas do tipo catepsina L. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) da cisteíno peptidase de *S. levis* foi calculada e os melhores valores de (k_{cat}/K_m) foram obtidos com os substratos Z-Phe-Arg-MCA e Z-Leu-Arg-MCA. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) para a hidrólise destes substratos foram, respectivamente, 20 μ M e 30 μ M (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com o comportamento de enzimas do tipo catepsina L as quais tem uma potente ação em substratos que possuem aminoácidos hidrofóbicos em P2 (Kärgel *et al*, 1980). A especificidade do substrato é determinada pelas interações em P₂ e S₂, assim o subsítio S2 da cisteíno peptidase é descrito como sendo essencial para esta especificidade (Turk *et al*, 1998). Estudos realizados com uma cisteíno peptidase do tipo catepsina L isolada do equinodermata *Sea cucumber* (*Stichopus japonicus*) demonstraram que o melhor substrato testado para este tipo de enzima foi o Z-Phe-Arg-MCA com valor de k_{cat}/K_m de 18 μ M, uma eficiência catalítica equivalente aos valores encontrados na com mesmo substrato hidrolisado pela enzima de *S.levis* (Yang *et al*, 2008). O substrato Z-Arg-Arg-MCA contendo Arginina, um resíduo não hidrofóbico em P2, foi resistente a hidrólise pela cisteíno peptidase de *S.levis* (Tabela1). Geralmente, o Z-Arg-Arg-MCA é um bom substrato para catepsinas B e H (Aranish, 1997). Estes resultados indicam que a enzima purificada de *S. levis* é uma cisteíno peptidase do tipo catepsina L.

Tabela 2. Constantes de segunda ordem (k_{cat}/K_m) para a hidrólise de substratos fluorogênicos pela cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis*

<i>SUBSTRATO</i>	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	K_m (μM)
Z-FR-MCA	20	10
Z-LR-MCA	30	0,21
Z-RR-MCA	Resistente	Resistente

Z-FR-MCA, carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina; Z-LR-MCA, carbobenzoxi-Leu-Arg-7-amido-4-metilcoumarina e Z-RR-MCA; carbobenzoxi-Arg-Arg-7-amido-4-metilcoumarina

4.4. Perfil de atividade em diferentes condições de pH e NaCl.

O efeito do pH na hidrólise do substrato Z-FR-MCA pela cisteíno peptidase de *S. levis* foi determinado nas faixas de pH entre 3.0 a 9.0. Na figura 4 pode-se observar uma curva que mostra o pH ótimo de 6.0 para a cisteíno peptidase. Este valor de pH é característico para as cisteíno peptidases, as quais são geralmente ativas em valores de pH entre 4.5 a 6.0 (Turk *et al*, 2000). Para determinar a influência do NaCl na atividade da enzima, ensaios de atividade enzimática foram feitos nas mesmas condições descritas no item 3.4. No gráfico apresentado na figura 4 foi observado uma atividade da enzima de 100 % na ausência de NaCl. Na concentração de 100 mM de NaCl a atividade da enzima foi de 60 %, demonstrando uma perda de 40 % de atividade comparada com a atividade inicial. Baseada na curva de NaCl, pode-se concluir que o sal promove uma influência significativa, diminuindo a eficiência da atividade catalítica da enzima, como observado na figura 7.

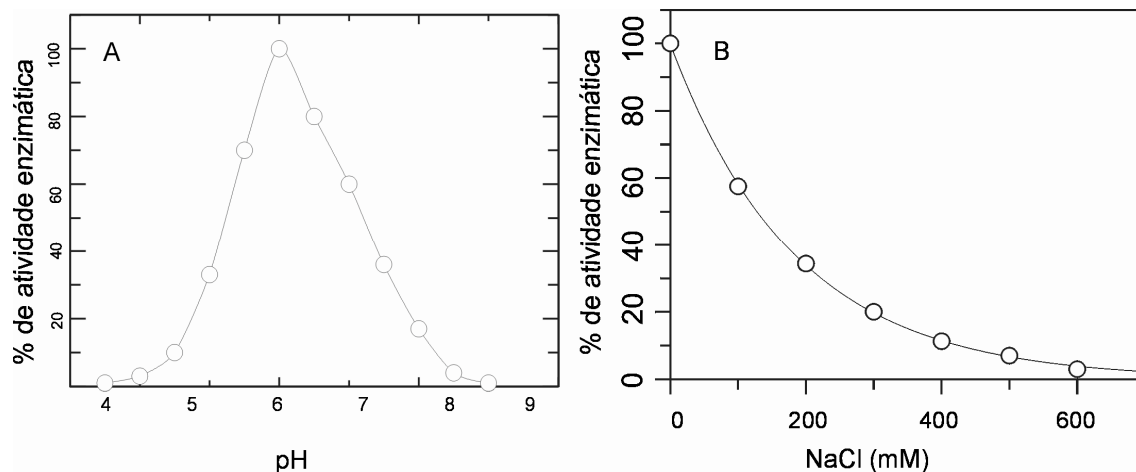


Figura 7. Influência do pH e NaCl na hidrólise do substrato Z-FR-MCA pela cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis*. A atividade da peptidase foi realizada em diferentes valores de pH variando entre 3.0 a 9.0 e concentrações de NaCl de 50 a 600mM.

4.5. Ensaio de atividade inibitória da cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis*

A cisteíno peptidase de *S. levis* foi ensaiada na presença de inibidores de cisteíno peptidases recombinantes isoladas da: cana-de-açúcar: CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4; do arroz: Orizacistatina I (OC-1); e o inibidores sintéticos E-64 e CA074. As quatro cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar foram capazes de inibir a atividade da cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis* com constantes de inibição (K_i app) na ordem de nanomolar (Tabela 3, Figura 8) sendo que o inibidor CaneCPI-1 foi capaz de inibir a cisteíno peptidase de *S.levis* com uma constante de inibição de 0.59 nM (K_i app). Este resultado está de acordo com um ensaio de inibição realizado anteriormente com o mesmo inibidor, onde foi observado um (K_i app) de 0.6 nM contra uma cisteíno peptidase humana do tipo catepsina L (Oliva *et al*, 2006). As outras cistatinas de cana-de-açúcar CaneCPI-2 e CaneCPI-3 apresentaram valores de K_i app de 0.36 e 0.57 nM para a cisteíno peptidase de *S. levis*. A cistatina CaneCPI-4 mostrou ser o melhor inibidor para esta enzima com um K_i app de 0,02 nM. Em estudos de inibição realizados utilizando as mesmas cistatinas

CaneCPI-2, Cane-CPI-3 e CaneCPI-4 contra uma cisteíno peptidase humana do tipo catepsina L, os valores de K_i app apresentados foram 0,17, 0,6 e 0,02 nM, respectivamente (Gianotti *et al*, 2006).

Inibidores	K_i app (nM)
CaneCPI-1	0,59
CaneCPI-2	0,36
CaneCPI-3	0,57
CaneCPI-4	0,024
OC-1	0,47
E-64	3,6
CA074	NI*

* NI: ausência de inibição.

Tabela 3. Inibição de atividade da cisteíno peptidase de *Sphenophorus levis* por diferentes inibidores de cisteíno peptidases.

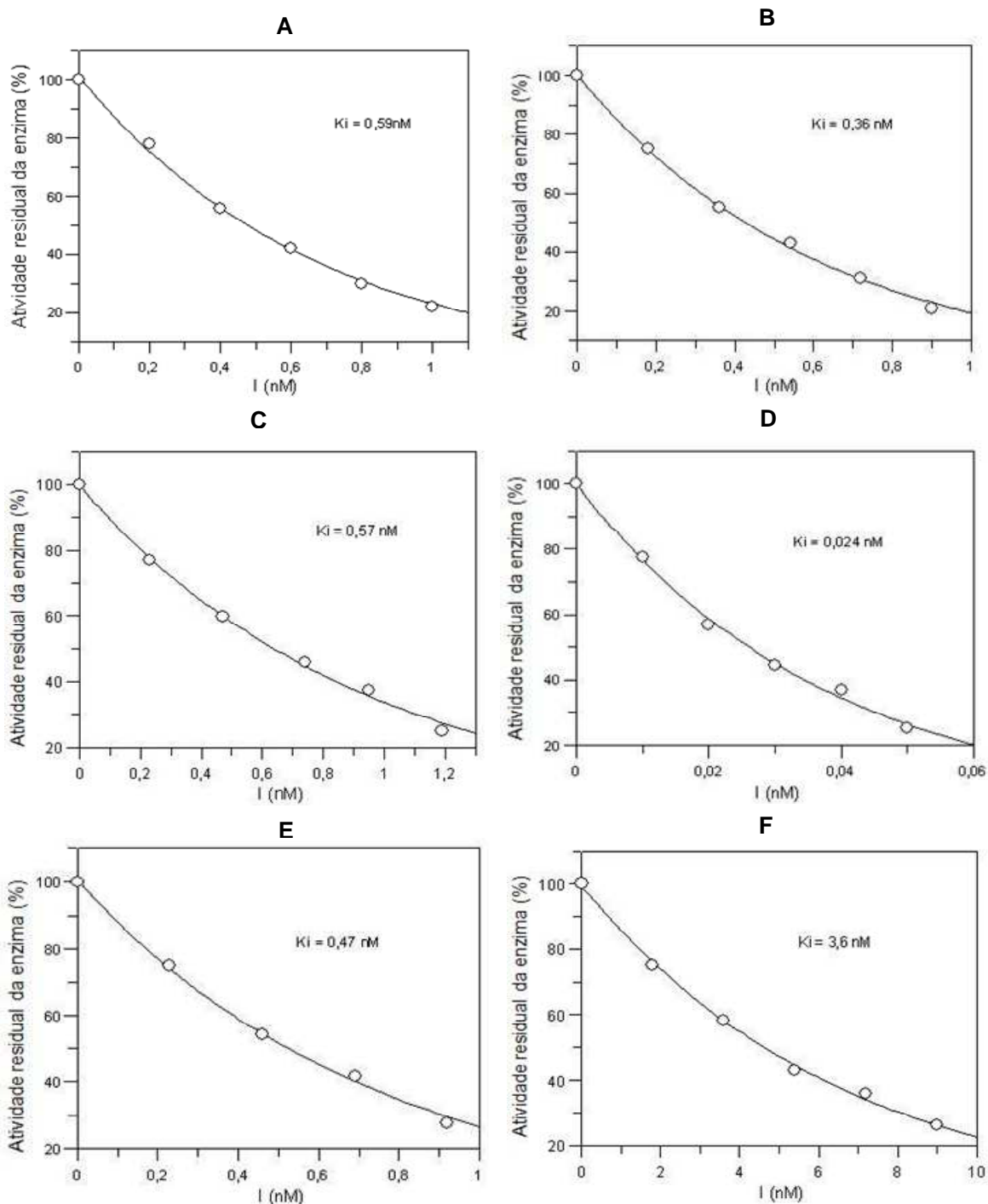


Figura 8: Inibição da atividade da cisteíno peptidase isolada de *Sphenophorus levis* pelas cistatinas recombinantes e pelo inibidor sintético E64. A atividade inibitória das cistatinas CaneCPI-1 (em A), CaneCPI-2 (em B), CaneCPI-3 (em C), CaneCPI-4 (em D), OC-1 (em E) e o inibidor sintético E64 (em F) contra a cisteíno peptidase de *S. levis* foi medida em um ensaio fluorimétrico utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA. A atividade residual da enzima foi calculada através da inclinação (“slopes”) das retas geradas com o programa FL “Solutions” 2.0 e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ensaio sem a cistatina).

Os resultados de inibição de atividade encontrados para catepsina L humana são muito similares aos valores encontrados para a inibição da cisteíno peptidase de *S. levis*, o que também sugere que esta enzima pode ser caracterizada como sendo uma catepsina L.

O inibidor sintético específico para catepsina B utilizado, o CA074 foi desenhado e sintetizado como derivado do E64, e apresenta capacidade inibitória seletiva contra catepsina B tanto “in vivo” quanto “in vitro”. Sua especificidade se deve aos resíduos Ile e Pro presentes em sua seqüência (Towatari *et al*, 1991; Murata, *et al*, 1991), assistida por uma dupla ponte de hidrogênio entre o grupo carboxil da porção C-terminal do CA074 e os grupos imidazólicos das histidinas 110 e 111 da catepsina B humana. Sua ligação se dá nos subsítios S´ da catepsina B humana. No presente estudo, os testes de inibição utilizando CA074 revelaram que o inibidor não foi capaz de inibir a peptidase isolada do inseto, contribuindo para que seja sustentada a hipótese de que a peptidase isolada de *S. levis* seja uma cisteíno peptidase do tipo catepsina L.

Como esperado, para o perfil de uma cisteíno peptidase o inibidor sintético E-64 foi capaz de inibir a atividade desta enzima consideravelmente com um valor de K_i app = 3.6 nM. O E64 é um inibidor natural de cisteíno peptidase, isolado de culturas de *Aspergillus japonicus* tendo sido relatado pela primeira vez por Hanada e colaboradores (1978). Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade inibitória de E64 contra cisteíno peptidases da família da papaína (Barrett *et al*, 1981; Barrett *et al*, 1982; Otto e Schirmeister, 1997). Sua interação com a enzima ocorre tanto nos subsítios S como S´ (Varughese *et al*, 1989).

A ocorrência de cisteíno peptidases em intestino de *S. levis* é esperada devido ao fato deste besouro pertencer a família Curculionidae, que está incluída no grupo Cucujiformia, um ancestral de coleópteros. Alguns estudos relataram que as cisteíno

peptidases são encontradas em toda a ordem coleoptera sugerindo que o ancestral do coleóptero, ao ingerir sementes ricas de inibidores de serino peptidases, passou a utilizar cisteíno peptidases na digestão de proteínas ao invés de serino peptidases após um processo de adaptação (Terra & Cristofolletti, 1996).

A cistatina recombinante OC-1 (orizacistatina 1, inibidor de cisteíno protease isolada do arroz) também foi capaz de inibir a atividade da cisteíno peptidase de *S. levis* com uma constante de inibição (K_i app) de 0,47 nM, resultado semelhante ao verificado pela inibição com as cistatinas recombinantes da cana-de açúcar. Esse resultado já era esperado devido a estudos na literatura que demonstram a inibição de cisteíno peptidases pela orizacistatina 1 (Azzouz *et al*, 2005 a e b; Bouchard *et al*, 2003; Benchabane *et al*, 2008). Além disso, em nossos estudos a OC-1 também se mostrou capaz de inibir catepsina L (valor de K_i app = 4,4 nM).

Diversas abordagens baseadas em modelos de estrutura e função têm sido utilizadas para a obtenção de inibidores de peptidases com potencial aumentado contra peptidases específicas, incluindo estudos de mutação sítio-dirigida de seqüências de resíduos de aminoácidos ou de aminoácidos específicos (Qasim *et al*, 1997; Mason *et al*, 1998; Ogawa *et al*, 2002; Pavlova & Björk, 2003; Goulet *et al*, 2008) além de procedimentos envolvendo mutações aleatórias em regiões específicas na seqüência dos inibidores (Laboissiere *et al*, 2002; Ceci *et al*, 2003; Melo *et al*, 2003; Stoop e Craik, 2003).

Nas plantas, a ampla distribuição de proteínas de defesa pode refletir a importância do processo de proteólise no processo digestivo de insetos. Para os insetos, a ingestão de inibidores de peptidases pode interferir diretamente na disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento, desenvolvimento e reprodução. Dessa maneira, é possível sugerir que a diversidade das enzimas proteolíticas descritas em

insetos fitófagos seja uma resposta para a presença abundante de inibidores de peptidases nos tecidos vegetais.

Atualmente, os principais métodos de controle aplicados para combater os fitopatógenos ainda são os que se baseiam na utilização de fungicidas e pesticidas, porém, muitas vezes o uso excessivo de pesticidas causa custos econômicos e ambientais. Além disso, uma das conseqüências do uso de pesticidas é o aparecimento de pragas resistentes a estes produtos (Gleddie *et al*, 1989). Dessa maneira, é evidente a necessidade do desenvolvimento de alternativas que diminuam o uso de produtos químicos, que não deixem resíduos indesejáveis no meio ambiente e que não permitam o aumento de populações de patógenos resistentes.

Frente aos avanços científicos e tecnológicos, é possível produzir plantas resistentes a pragas e patógenos por meio da manipulação de genes que codificam proteínas de resistência (Ryan, 1990). As plantas podem se tornar resistentes através da capacidade de codificar proteínas relacionadas à defesa, ou seja, através de proteínas que interfiram em alguma função metabólica vital para o organismo invasor. Assim, haveria uma possibilidade de se evitar o uso indiscriminado de agrotóxicos, a poluição do ambiente e ainda diminuir custos na produção.

A expressão de cistatinas recombinantes em plantas transgênicas tem sido proposta por diversos autores como método de controle de herbivoria, para o controle microbiano de fungos e outros patógenos de importância agronômica (Gutierrez-Campos *et al*, 1999; Arai & Abe, 2000; Atkinson *et al*, 2003; Haq *et al*, 2004; Yang & Yeh, 2005; Christova *et al*, 2006).

Apesar da evolução promissora, o uso de inibidores de peptidases em plantas transgênicas ainda não está amplamente consolidado. Os insetos herbívoros têm desenvolvido ao longo do tempo estratégias de escape para evitar o efeito inibitório das

cistatinas (Broadway, 1986). Esses mecanismos incluem a utilização de um sistema de complexos de enzimas digestivas com diversas classes de peptidases atuando de forma complementar e coordenada (Terra & Ferreira, 1994; Brunelle *et al*, 1999; Brunelle *et al*, 2004); a produção de formas alternativas de peptidases “insensíveis” aos inibidores (Jongsma *et al*, 1995; Bown *et al*, 1997; Cloutier *et al*, 1999, Cloutier *et al*, 2000; Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001a, b; Zhu-Salzman *et al*, 2003; Brunelle *et al*, 2004); e a degradação dos inibidores pela utilização de peptidases “não-alvo” do sistema digestivo (Michaud, 1997; Girard *et al*, 1998a; Giri *et al*, 1998; Gruden *et al*, 2003; Zhu-Salzman *et al*, 2003).

Assim, é reconhecido que, peptidases / inibidores e as interações planta-inseto consistem em um sistema resultante de um longo processo co-evolutivo e contínuo de diversificação de sistemas proteolíticos e inibidores de peptidases nos organismos concorrentes (Lopes *et al*, 2004; Valueva & Mosolov, 2004; Christeller, 2005; Kiggundu *et al*, 2006; Girard *et al*, 2007). Dentro desse contexto, o desenvolvimento de inibidores de peptidases com forte potencial específico para um determinado organismo, representa uma estratégia bastante interessante.

No presente estudo, foi realizada a identificação e caracterização de uma cisteíno peptidase purificada do trato digestivo da larva de *S. levis*. Os resultados demonstraram que houve a inibição significativa da atividade enzimática dessa cisteíno peptidase por cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar e do arroz. Isso sugere que essa enzima possa ser utilizada para estudos futuros contribuindo para a determinação das interações entre planta e patógenos como um potencial alvo para o controle dessa praga baseado na interrupção do metabolismo de proteínas que podem interferir no processo de digestão das cisteíno peptidases de *S. levis*. Estas cistatinas se mostraram específicas para esta

enzima, sugerindo a aplicação destes inibidores no desenvolvimento de plantas transgênicas que possam se tornar resistentes a este inseto.

5. CONCLUSÕES

- Neste trabalho foi realizada a purificação e caracterização de uma cisteíno peptidase proveniente do trato digestivo de larvas do inseto *S. levis*, um coleóptero que ataca a cana-de-açúcar sendo responsável por grandes prejuízos econômicos.
- A enzima foi submetida à espectrometria de massa por meio de digestão com tripsina e os três peptídeos resultantes foram comparados com a sequência de um clone de cDNA obtido em nosso laboratório depositado referente a uma cisteíno peptidase de *S. levis*, revelando ser uma enzima do tipo cisteíno peptidase.
- Os ensaios de atividade enzimática demonstraram que a cisteíno peptidase de *S. levis* tem uma potente ação sobre o Z-Phe-Arg-MCA, um substrato específico comumente utilizado para ensaios de atividade de enzimas do tipo catepsina L.
- As análises do perfil de atividade em diferentes condições de pH foi observado que a enzima apresentou melhor atividade em pH 6.0, que é característico para enzimas do tipo cisteíno peptidases.
- Nos ensaios de influência da concentração de NaCl na atividade enzimática pode-se concluir que o sal promoveu influência significativa, diminuindo a atividade catalítica da enzima.
- A atividade inibitória da cisteíno peptidase de *S. levis* foi testada na presença de inibidores de cisteíno peptidases recombinantes isoladas de cana-de-açúcar, denominados cistatinas, CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3 e Cane-CPI-4, uma outra isolada do arroz, a OC-1, e dos inibidores sintéticos E-64 e CA074. As análises revelaram que as quatro cistatinas da cana-de-açúcar foram capazes de inibir a atividade da enzima.

- Os resultados de inibição da cisteíno peptidase de *S. levis* foram comparados os resultados de inibição de atividade encontrados para a catepsina L humana foram muito semelhantes sugerindo, também, que esta enzima possivelmente seja caracterizada como sendo uma catepsina do tipo L.
- O inibidor sintético CA074, que é específico para catepsina B não foi capaz de inibir a peptidase isolada do inseto, contribuindo para que seja sustentada a hipótese de que a peptidase isolada de *S. levis* seja do tipo catepsina L. A OC-1 e o inibidor sintético E64 também foram capazes de inibir a peptidase isolada de *S. levis* contribuindo para caracterizá-la como uma peptidase do tipo cisteínica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **J. Biol. Chem.**, v. 262(35), p. 16793-7. 1987.

AZZOUZ, H.; CAMPAN, E. D.; CHERQUI, A.; SAGUEZ, J.; COUTY, A.; JOUANIN, L.; GIORDANENGO, P.; KAISER, L. Potential effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). **J. Insect. Physiol.**, v. 51(8), p. 941-51, 2005.

AZZOUZ, H.; CHERQUI, A.; CAMPAN, E. D.; RAHBÉ, Y.; DUPORT, G.; JOUANIN, L.; KAISER, L.; GIORDANENGO, P. Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). **J. Insect. Physiol.**, v. 51(1), p. 75-86, 2005.

ARAI, S.; ABE, K. Cystatin-based control of insects, with special reference to oryzacystatin (2000). In MICHAUD, D. (ed), **Recombinant protease inhibitors in plants**. Landes Bioscience, Georgetown TX, p 27-42.

ARANISHI, F.; HARA, K.; OSATOMI, K.; ISHIHARA, T. Substrate specificity of carp *Cyprinus carpio* cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v.116(2) ,p. 203-8, 1997.

ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E.; MCPHERSON, M. J.; Engineering plants for nematode resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, p. 41, p. 615-639, 2003.

BARRETT, A. J.; KIRSCHKE, H. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. **Method Enzymol.**, v. 80, p. 535-561, 1981.

BARRETT, A. J.; KEMHAVI, A .A.; BROWN, M. A.; *et al.* K. E-64 [L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors

of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **Biochem. J.**, v. 201, p. 189-198, 1982.

BENCHABANE, M.; GOULET, M. C.; DALLAIRE, C.; CÔTÉ, P. L.; MICHAUD, D. Hybrid protease inhibitors for pest and pathogen control--a functional cost for the fusion partners? **Plant. Physiol. Biochem.**, v. 46(7), p. 701-8, 2008.

BENCHEKROUN, A.; MICHAUD, D.; NGUYEN-QUOC, B.; OVERNEY, S.; DESJARDINS, Y.; AND YELLE, S. Synthesis of active oryzacystatin I in transgenic potato plants. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 585-588, 1995.

BENTO, J. M. S. Perdas por insetos na agricultura. **Ação Ambiental II**, v. 4, p. 19-21, 1999.

BOUCHARD, E.; MICHAUD, D.; CLOUTIER, C. Molecular interactions between an insect predator and its herbivore prey on transgenic potato expressing a cysteine proteinase inhibitor from rice. **Mol. Ecol.**, v. 12(9), p. 2429-37, 2003.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 27, p. 625-638, 1997.

BRADFORD M. M. A Rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyses Biochemical**, v. 72, p.248-254, 1976.

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v.32, p. 827-833, 1986.

BRUNELLE, F.; NGUYEN-QUOC, B.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Protein hydrolysis by Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.**, v. 42, p. 88-98, 1999.

BRUNELLE, F.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Colorado potato beetles compensate for tomato cathepsin D inhibitor expressed in transgenic potato. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.**, v. 55, p. 103-113, 2004.

BUZZI, Z. J.; MIYAZAKI, R. D. Entomologia didática. Editora da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1999. p. 262.

CAMPOS, F. A.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C. P.; ARY, M. B. Resolution and partial characterization of proteinases and alpha-amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 92, p. 51-57, 1989.

CECI, L. R.; VOLPICELLA, M.; RAHBÉ, Y.; GALLERANI, R.; BEEKWILDER, J.; JONGSMA, M. A. Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against aphids. **Plant. J.**, v. 33, p. 557-566, 2003.

CERDA, H.; FERNANDEZ, G.; LOPEZ, A.; VARGAS, J. Olfactory attraction of the sugarcane weevil (Coleoptera: curculionidae) to host plant odors and its aggregation pheromone. *Fla. entomologu.* v.82, p. 103-112, 1999.

CHAPMAN, R. F. The insects: structure and function. Cambridge University Press, Cambridge. 1998. p. 770.

CHEN, M.; JOHNSON, B.; WEN, L.; MUTHUKRIHNNAN, S.; Rice cystatin bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibitory activity and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. **Protein Expression and Purification**, v.3, p. 41-49, 1992.

CHRISTELLER, J. T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. **FEBS. J.**, v. 272, p. 5710-5722, 2005.

CHRISTOVA, P. K.; CHRISTOV, N. K.; IMAI, R. A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*. **Planta**, v. 223, p. 1207-1218, 2006.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 35(8), p. 883-901, 2005.

CRISTOFOLETTI, P. T.; TERRA, W.R. Midgut Proteinases in Three Divergent Species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.113 (4), p.725-730, 1996.

CLOUTIER, C.; FOURNIER, M.; JEAN, C.; YELLE, S.; MICHAUD, D. Growth compensation and faster development of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on potato foliage expressing oryzacystatin I. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.**, v. 40: p. 69-79, 1999.

CLOUTIER, C.; JEAN, C.; FOURNIER, M.; YELLE, S.; MICHAUD, D. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata*, compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.**, v. 44, p. 69-81, 2000.

DALY, H. V.; DOYEN, J. T & PURCELL, A. H. **Introduction to insect biology and diversity**. Second Edition. Oxford University Press, New York, 1998.

DANILES, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed). Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam: Elsevier. 1987. p. 7-84.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S.; ALMEIDA, L. L.; CASTILHO, H. J. Biologia de *Sphenophorus Levis* (Vaurie, 1978) (Coleóptera: Curculionidae) em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária do Brasil**, Brasília, v. 22(6), p. 556-558, 1987.

DE OLIVEIRA-NETO, O. B.; BATISTA, J. A.; RIGDEN D. J.; FRANCO, O. L.; FRAGOSO, R. R.; MONTEIRO, A. C.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-de, A. S. M. F. Molecular cloning of a cysteine proteinase cDNA from the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68(6), p. 1235-42, 2004.

DUAN X, LI X, XUE Q, ABO-EL-SAAD M, XU D, WU R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. **Nat. Biotechnol.**, v. 14(4), p. 494-8, 1996.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar (5). Encarte das Informações Agronômicas, v. 110, p. 25-32, 2005.

GALLO, D., O.; NAKANO, S.; SILVEIRA NETO, R. P. L.; CARVALHO, G. C. BAPTISTA, E.; BERTI FILHO, J. R. P.; PARRA, R. A.; ZUCCHI, S. B.; ALVES, J. D.; VENDRAMIM, L. C.; MARCHINI, J. R. S.; LOPES & C.; OMOTO. **Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ.**, 920p. 2002.

GATEHOUSE, A. M. R., HILDER, V. A., GATEHOSE, J. A. Control of insect pests by plant genetic engineering. Proceedings of the royal society of Edinburgh- **Biological Sciences**, v. 99B(3-4), p. 51-60, 1992.

GIANOTTI, A.; RIOS, W. M.; SOARES-COSTA, A.; NOGAROTO, V.; CARMONA, A. K.; OLIVA, M. L.; ANDRADE, S. S.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein. Expr. Purif.**, v. 47(2), p. 483-9, 2006.

GIANOTTI, A.; SOMMER, C. A.; CARMONA, A. K.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biol. Chem.**, v.389(4), p. 447-53, 2008.

GIRARD, C.; LE MÉTAYER, M.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M. H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors maybe conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 28, p. 229-237. 1998a.

GIRARD, C.; LE MÉTAYER, M.; ZACCOMER, B.; BARTLET, E.; WILLIAMS, I.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M.; JOUANIN, L. Growth stimulation of beetle larvae reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. **J. Insect. Physiol.**, v. 44(3-4), p. 263-27, 1998b.

GIRARD, C.; RIVARD, D.; KIGGUNDU, A.; KUNERT, K.; GLEDDIE, S. C.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. A multicomponent, elicitor-inducible cystatin complex in tomato, *Solanum lycopersicum*. **New. Phytol.**, v. 173, p. 841-851, 2007.

GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; DESHPANDE, V. V.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. **Plant. Physiol.**, v. 116, p. 393-401, 1998.

GLEDDIE, S.; LELLER, W. A. Protoplast fusion technology. **Journal Tissue Culture Methods**, v. 12, p. 157-162, 1989.

GOULET, M. C. DALLAIRE, C.; VAILLANCOURT, L. P.; KHALF, M.; BADRI, A. M.; PRERADOV, A.; DUCEPPE, M. O.; GOULET, C.; CLOUTIER, C.; and MICHAUD, D. Tailoring the Specificity of a Plant Cystatin towards Herbivorous Insect Digestive Cysteine Proteases by Single Mutations at Positively Selected Amino Acid Sites. **Plant Physiology Herbivore-Specific Cystatin Variants**, v. 146, p. 1010-1019, 2008.

GRUDEN, K.; POPOVIC, T.; CIMERMAN, N.; KRIZAJ, I.; STRUKELJ, B. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, 'intestains', enable Colorado potato beetle larvae to counteract the potato defense mechanism. **Biol. Chem.**, v. 384, p. 305-310, 2003.

GUTIERREZ-CAMPOS, R.; TORRES-ACOSTA, J. A.; SAUCEDO-ARIAS, L. J.; GOMEZ-LIM, M. A. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 1223-1226, 1999.

HANADA, K. L-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amido(4-guanidino)butane] and related epoxides as inhibitors of cysteine proteinases. **Acta Biol Med Ger**, v. 40(10-11), p. 1513-1517, 1981.

HANADA, K.; TAMAI, M.; YAMAGISHI, M.; OHMURA, S.; SAWADA, J.; TANAKA, I. **Agric. Biol. Chem.**, v. 42, p. 523-528, 1978.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Arch Biochem Biophys**, v. 431, p. 145-159, 2004.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A.; SHEERMAN, S. E.; BARKER, R. F.; BOUTLER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.300, p.160-1987.

HILDER, V. .; BOUTLER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. **Crop Protection**, v.14, p.177-191, 1999.

JONGSMA, M. A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH D.; STIEKEMA, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, p. 8041-8045, 1995.

KÄRGEL, H. J, DETTMER, R, ETZOLD, G, KIRSCHKE, H, BOHLEY, P, LANGNER, J. Action of cathepsin L on the oxidized B-chain of bovine insulin. **FEBS Lett.**, v. 114(2), p. 257-60, 1980.

KIGGUNDU, A.; GOULET, M. C.; GOULET, C.; DUBUC, J. F.; RIVARD, D.; BENCHABANE, M.; PEPIN, G.; VAN DER VYVER, C.; KUNERT, K.; MICHAUD, D. Modulating the proteinase inhibitory profile of a plant cystatin by single mutations at positively selected amino acid sites. **Plant. J.**, v. 48, p. 403-413, 2006.

KRATTIGER, A. F. Insect resistance in crops: a case study of bacillus Thuringiensis (Bt) and its transfer to developing countries. **ISAAA Briefs.**, v. 2, p.42, 1997.

LABOISSIERE, M. C.; YOUNG, M. M.; PINHO, R. G.; TODD, S.; FLETTERICK, R. J.; KUNTZ, I.; CRAIK, C. S. Computer-assisted mutagenesis of ecotin to engineer its secondary binding site for urokinase inhibition. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 26623-26631, 2002.

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

LEATHERBARROW, R. J. Grafit, version 5.0, Erithacus software Ltd; Stains, UK, 1992.

LEITE, L. G.; FILHO, A. B.; TAVARES, F. M.; GINARTE, C. M. A.; ALMEIDA, L. C.; BOTELHO, P. S. M. Alternativa de controle: Bicudo da cana-de-açúcar. **Cultivar Grandes Culturas**. 2005 (www.cultivar.inf.br).

LEPLÉ J. C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; AUGUSTIN, S.; PILATE, G.; DUMANOIS LÊ TÂN, V.; DELPLANQUE, A., CORNU, D.; JOUNANIN, L. Toxicity of to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. **Mol. Breed.**, v. 1, p. 319-328, 1995.

LIANG, C.; BROOKHART, G.; FENG, G. H.; REECK, G. R.; KRAMER, K. J. Inhibition of digestive proteinases of stored grain Coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. **FEBS. Lett.**, v.278(2), p. 139-42, 1991.

LIMA, M. A.C.; GARCIA, R. O.; GILBERTO, MARTINS, S.; MANSUR, E. Morfogênese “in vitro” e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Rev Brasileira Botânica**, v. 24 n. 1, 2001.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.**, v. 55, p. 140-152, 2004.

MARTINEZ, M.; ABRAHAM, Z.; GAMBARDELLA, M.; ECHAIDE, M.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 1821-1829, 2005.

MASON, R. W.; SOL-CHURCH, K.; ABRAHAMSON, M. Amino acid substitutions in the N-terminal segment of cystatin C create selective protein inhibitors of lysosomal cysteine proteinases. **Biochem. J.**, v. 330, p. 833-838, 1998.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R. M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 31, p. 645-657, 2001a.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R. M. Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 31: 633-644, 2001b.

McMANUS, M.; McGREGOR, P. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgen Res**, v.3, p. 50-58, 1994.

MELO, F. R.; MELLO, M. O.; FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELLO, L. V.; GENU, A.; M.; SILVA-FILHO, M. C.; GLEDDIE, S.; GROSSI-DE-SA, M. F. Use of phage display to select novel cystatins specific for *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinases. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1651, p. 146-152, 2003.

MÉNARD, R.; CARMONA, E.; PLOUFFE, C.; BRÖMME, D.; KONISHI, Y.; LEFEBVRE, J.; STORER, A. C. The specificity of the S1' subsite of cysteine proteases. **FEBS. Lett.**, v. 328(1-2):p.107-10, 1993.

MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. **Trends. Biotechnol.**, v.15, p. 4-6, 1997.

MURATA, M.; MIYASHITA, S.; YOKOO, C.; TAMAI, M.; HANADA, K.; HATAYAMA, K.; TOWATARI, T.; NIKAWA, T.; KATUNUMA, N. Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro. **FEBS. Lett.**, v. 280(2), p. 307-310, 1991.

MURDOCK, L. L.; BOOKHART, G.; DUNN, .P. E.; FOARD, D. E.; KELLEY, S.; KITCH, L., SHADE, R. E.; SHUCKLE, R. H.; WOLFSON, J. L. Cystatine digestive

proteinase in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 87, p. 783-787, 1987.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 50(22), p. 6605-11, 2002.

OGAWA, M.; NAKAMURA, S.; SCAMAN, C. H.; JING, H.; KITTS, D. D.; DOU, J.; NAKAI, S. Enhancement of proteinase inhibitory activity of recombinant human cystatin C using random-centroid optimization. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1599, p. 115-124, 2002.

OLIVA, M. L.; CARMONA, A. K.; ANDRADE, S. S.; COTRIN, S. S.; SOARES-COSTA, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, v. 320(4), p. 1082-6, 2004.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their Inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 133-171, 1997.

PAVLOVA, A.; BJÖRK, I. Grafting of features of cystatins C or B into the N-terminal region or second binding loop of cystatin A (stefin A) substantially enhances inhibition of cysteine proteinases. **Biochemistry**, v. 42, p. 11326-11333, 2003.

PINTO, A. S.; GARCIA, J. F.; de OLIVEIRA, H. N. Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In Vanzolini, S. S.; SENE, A. P.; JENDIROBA, E.; NOBREGA, J. C. M. Atualização em produção de cana-de-açúcar. São Paulo. ED. Prol, 2006 p. 257-280.

PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. D. B. Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus Levis Vaurie*, 1978 (Coleoptera: curculionidae) em cana-de-açúcar. São Paulo: COPERSUCAR (Boletim Técnico: Edição Especial), 15 p., 1990.

QASIM, M. A.; GANZ, P. J.; SAUNDERS, C. W.; BATEMAN, K. S.; JAMES, M. N.; LASKOWSKI, M. JR. Interscaffolding additivity. Association of P1 variants of eglin c

and of turkey ovomucoid third domain with serine proteinases. **Biochemistry**, v. 36, p. 1598-1607, 1997.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p. 425-449, 1990.

SACIOTO, S. F. Z. **Inserção do gene *PR5K* em cana-de-açúcar visando induzir a resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 74p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine peptidases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 27, p. 157-162, 1967.

SIQUEIRA-JUNIOR, C. L.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; CUNHA, M.; GOMES, V. M.; MOURA, D.; JACINTO, T. 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defence protein and forms crystals in prosystemin over-expressing transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 247-254, 2002.

SOARES-COSTA, A., BELTRAMINI, L. M., THIEMANN, O. H.; HENRIQUE-SILVA, F. A Sugarcane cystatin: recombinant expression, purification and antifungal activity **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296(5), p.1194-1199, 2002.

STOOP, A. A.; CRAIK, C. S. Engineering of a macromolecular scaffold to develop specific protease inhibitors. **Nat. Biotechnol.**, v. 21 p. 1063-1068, 2003.

STORER, A. C.; MÉNARD, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods. Enzymol.**, v. 244, p. 486-500, 1994.

STUPIELLO, J. P. A cana-de-açúcar como matéria prima. In: PARANHOS, S. B. (Ed). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. v. 2, p. 187-259.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.109, p. 1-62, 1994.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; JORDÃO, B. P.; DILLON, R.J. Digestive enzymes. In: Lehane, M. J. and Billingsley, P. F. Editors, **Biology of the Insect Midgut**. New York. Chapman & Hall. 1996 a. chap 6. p: 153-194.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BACKER, J. E. Compartmentalization of digestion. In: Lehane, M. J. ; Billingsley, P. F.Editors, **Biology of the Insect Midgut**. New York: Chapman & Hall. 1996 b. chap 8, p. 206-235.

TERRA, W. R.; CRISTOFOLETTI, P. Midgut proteinases in three divergent species of coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113, n.4, p. 725-730, 1996.

TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion: on evolutionary perspective. **Brazilian. Med. Biol. Res.** v. 28, p: 675:734, 1998.

TOWATARI T.; NIKAWA, T.; MURATA, M.; YOKOO, C.; TAMAI, M.; HANADA, K.; KATUNUMA, N. Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. **FEBS. Lett.**, v. 280(2), p. 311-315, 1991.

TURK, D., GUNCAR, G., PODOBNIK, M., TURK, B. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine peptidases. **Biol. Chem.**, v. 379, p. 137-147, 1998.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Review: lysosomal cysteine peptidases: more than scavengers. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1477, p. 98–111, 2000.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, v. 69: p. 1305-1309, 2004.

VANIN, S.A. A new species *Sphenophorus* from Brazil. Departamento de zoologia, Instituto de Biociências, USP-SP, São Paulo. p. 9, 1988.

VARUGHESE, K. I.; AHMED, F. R.; CAREY, P. R.; HASNAIN, S.; HUBER, C. P.; STORER, A.C. Crystal structure of a papain-E-64 complex. **Biochemistry**, v. 28(3), p. 1330-1332, 1989.

VAURIE, P. Revision of the genus *Sphenophorus* in South America. American Museum Novitates. New york, n. 2659, p. 1-30. 1978.

RIBEIRO, C. W. Estabelecimento de uma cana-de-açúcar transgênica superexpressando o gene da canacistaina (*CaneCPI-1*), uma proteína inibidora de cisteína protease. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Genética e Evolução) - Programa de Pós-Graduação de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007. Disponível em <<http://www.teses.>>. Acesso em março de 2009.

WIEDERANDERS, B.; KAULMANN, G.; SCHILLING, K. Functions of propeptide parts in cysteine proteases. **Curr. Protein. Pept. Sci.**, v. 4(5), p. 309-26. 2003.

YANG, A. H.; YEH, K. W. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no. 1). **Planta**, v. 221 p. 493-501, 2005.

ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; SHADE, R. E.; AHN, J. E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect. Mol. Biol.**, v. 12, p. 135-145, 2003.