

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**“PRODUÇÃO RECOMBINANTE E ESTUDOS FUNCIONAIS DE TRÊS  
NOVAS CISTATINAS DA CANA-DE-AÇÚCAR E SUA UTILIZAÇÃO  
EM ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA ADESÃO, PROLIFERAÇÃO,  
MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR”**

**ANDRÉIA GIANOTTI**

**SÃO CARLOS**

**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**“PRODUÇÃO RECOMBINANTE E ESTUDOS FUNCIONAIS DE TRÊS  
NOVAS CISTATINAS DA CANA-DE-AÇÚCAR E SUA UTILIZAÇÃO  
EM ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA ADESÃO, PROLIFERAÇÃO,  
MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR”**

**ANDRÉIA GIANOTTI**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética e Evolução.

**SÃO CARLOS**

**2008**

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

G434pr

Gianotti, Andréia.

Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular / Andréia Gianotti -- São Carlos : UFSCar, 2008.

119 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Genética molecular. 2. Câncer. 3. Cistatina. 4. Inibidor de cisteíno protease. 5. Cana-de-açúcar. I. Título.

CDD: 574.87328 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE E ESTUDOS FUNCIONAIS DE  
TRÊS NOVAS CISTATINAS DA CANA-DE-AÇÚCAR E SUA  
UTILIZAÇÃO EM ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA ADESÃO,  
PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR**

Tese de Doutorado de Andréia Gianotti

Banca Examinadora

Prof. Dr. Flávio Henrique Silva



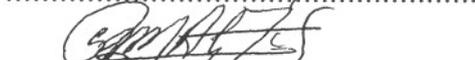
Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona



Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo



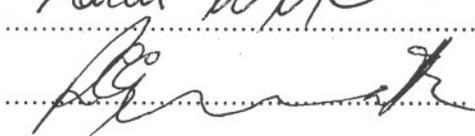
Prof. Dr. Rogério Margis



Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho



Prof. Dr. Richard Charles Garrat



---

Orientador

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

---

Co-orientadora

Profª Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona

Aos meus pais,  
Antonio Carlos e Precilda,  
à minha irmã Aline,  
e ao meu noivo César,  
pela dedicação, apoio  
e amor sem limites.

“O fazer científico está recheado do  
mais puro prazer infantil da  
descoberta.”

(Autor desconhecido)

## SÚMULA CURRICULAR

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Doutorado em Genética e Evolução (2008)**. Tese: “Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular.” Orientador: Dr. Flávio Henrique da Silva; Co-orientadora Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona. Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (em andamento).

- **Graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas (2004)**. Universidade Federal de São Carlos.

### PUBLICAÇÕES

- 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”. *Biological Chemistry (In Press)*

- Gianotti, A.; Rios, W.M.; Soares-Costa, A.; Nogaroto, V.; Carmona, A.K.; Oliva, M.L.V.; Andrade, S.S.; Henrique-Silva, F. “Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*)”. *Protein Expression and Purification* 47 (2006) 483-489.

- Nogaroto, V.; Tagliavini, S.A.; Gianotti, A.; Mikawa, A.; Barros N.M.T.; Puzer L.; Carmona, A.K.; Costa, P.I.; Henrique-Silva, F. “Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a non-pathogenic strain”. *FEMS Microbiology Letters* 261 (2006) 187-193.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, pela orientação, incentivo, confiança e amizade. Por todos esses anos em seu laboratório, desde a iniciação científica até hoje, pelas inúmeras oportunidades de aprendizado, as quais foram essenciais para minha formação.

À Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona (UNIFESP), pela co-orientação e pela amabilidade e atenção com que sempre nos recebeu em seu laboratório. Aos seus pós-graduandos Simone, Luciano e Nilana pela gentileza e disposição.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo (DCF-UFSCar), pela colaboração nos ensaios celulares, e pelo carinho com que sempre se dispôs a nos ajudar. Às suas pós-graduandas Raquel Mesquita e Márcia Cominetti pela amizade e disposição sempre oferecidas.

À Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva (UNIFESP), pela colaboração nos ensaios de inibição enzimática.

Ao Prof. Dr. Richard Garratt (IFSC-USP), pela colaboração nos estudos estruturais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos concedida e pelo financiamento deste trabalho por meio do Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME-CEPID).

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, pelo suporte e auxílio na realização deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da UFSCar, Regiane e Greissi, por todos os auxílios recebidos.

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Genética e Evolução, pela atenção e a amizade.

Aos colegas do laboratório, por toda a ajuda, o companheirismo e os momentos de descontração.

À amiga Viviane, pela amizade e cumplicidade em todos esses anos de convivência, desde a época da graduação.

À amiga Andrea, exemplo de dedicação e generosidade, por todos os conselhos e apoio constante em todos os momentos.

Ao meu amor César, pessoa maravilhosa ao lado da qual quero passar o resto da minha vida. Por todo o amor, a compreensão, a paciência e a dedicação incondicionais.

Aos meus pais, Antonio Carlos e Precilda, e à minha irmã Aline, minha tão amada família, aqueles que desde bem cedo me ensinaram o sentido da palavra amor, e que para sempre serão o meu porto seguro.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, e a todos os familiares e amigos que sempre torceram por mim.

## RESUMO

A principal causa de mortalidade em pacientes com câncer está associada ao estabelecimento de metástases pelo organismo. A degradação e invasão da matriz extracelular e lâmina basal, etapas chave no processo da metástase, envolvem a ação de enzimas proteolíticas. Em linhagens de células cancerosas as quantidades e a atividade das catepsinas B e L estão consideravelmente aumentadas, e têm sido correlacionadas ao potencial invasivo destas células. Ao mesmo tempo, as quantidades de seus inibidores endógenos, as cistatinas, estão consideravelmente diminuídas, gerando um desequilíbrio que contribui para o desenvolvimento do fenótipo metastático. Assim, no sentido de restabelecer o equilíbrio existente na célula normal, o uso das cistatinas como possíveis agentes terapêuticos em novas estratégias anti-câncer tem sido sugerido. O projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST – FAPESP) possibilitou a identificação de cerca de 20 possíveis cistatinas nesta planta. No presente trabalho, descreve-se a expressão heteróloga, purificação e caracterização de três cistatinas da cana-de-açúcar, denominadas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4, as quais apresentaram diferenças na ação inibitória contra as catepsinas B e L humanas. Enquanto as três cistatinas inibiram a catepsina L com valores de  $K_i$  de 0,17, 0,6 e 0,021 nM, respectivamente, somente a CaneCPI-4 foi capaz de inibir eficientemente a catepsina B ( $K_i = 0,83$  nM). Considerando o envolvimento das catepsinas B e L na invasão das células tumorais, o efeito das cistatinas da cana-de-açúcar sobre a habilidade invasiva da linhagem celular de câncer mamário humano MDA-MB-231 foi avaliado por meio da adição das cistatinas recombinantes às células, e também utilizando células transfectadas com os genes das cistatinas. De modo geral, os valores de  $K_i$  correlacionaram-se com a capacidade das cistatinas de inibir a atividade de cisteíno catepsinas das células tumorais, assim como, a invasão celular através de uma matriz de Matrigel®. As células que expressavam a cistatina CaneCPI-4 apresentaram uma pequena redução na habilidade invasiva. Por outro lado, uma redução de ~ 60% na invasão celular foi obtida com 2  $\mu$ M das cistatinas recombinantes CaneCPI-2 ou CaneCPI-3, ou 0,2  $\mu$ M de CaneCPI-4. Entretanto, as cistatinas não apresentaram nenhum efeito sobre a adesão e a proliferação destas células. Nossos resultados abrem a possibilidade de considerar estas, assim como outras fitocistatinas, como possíveis agentes terapêuticos em estratégias anti-câncer.

## ABSTRACT

Tumor metastasis is usually a major cause of death among cancer patients. Degradation and invasion of the extracellular matrix and basement membrane, key steps in the metastatic process, rely on the activity of proteolytic enzymes. The levels and activities of cathepsins B and L are considerably increased in cancer cells, and have been related to the invasive potential of these cells. Moreover, the levels of their endogenous inhibitors, the cystatins, are decreased, which results in an imbalance that contributes to the development of the metastatic phenotype. Thus, the potential use of cystatins as therapeutic agents in novel anti cancer strategies has been suggested. The sugarcane genome project (SUCEST – FAPESP) allowed the identification of about 20 putative cystatins in this plant. In the present study, we describe the heterologous expression, purification and characterization of three cystatins from sugarcane, dubbed as CaneCPI-2, CaneCPI-3 and CaneCPI-4, which showed different inhibitory activities against human cathepsins B and L. While the three recombinant cystatins inhibited cathepsin L activity with  $K_i$  values of 0.17, 0.6 and 0.021 nM, respectively, only CaneCPI-4 was capable of efficiently inhibiting cathepsin B activity ( $K_i = 0.83$  nM). Considering the involvement of these cathepsins in tumor cell invasion, the effect of the cystatins on the invasive ability of human breast cancer MDA-MB-231 cells was assessed after the addition of the recombinant cystatins to the cells, and in cell clones expressing the sugarcane cystatins. Overall, the  $K_i$  values correlated with the ability of the cystatins to inhibiting the cysteine cathepsin activity of the tumor cells as well as the cell invasion through a Matrigel<sup>®</sup> matrix. A slight reduction in the invasive ability was observed in the MDA-MB-231 cells expressing CaneCPI-4. In addition, a substantial reduction of ~ 60% in the cell invasion was obtained in the presence of 2  $\mu$ M recombinant CaneCPI-2 or CaneCPI-3, or 0.2  $\mu$ M of CaneCPI-4. Finally, the cystatins showed negligible effects on the adhesion and proliferation of the cells. Our results open the possibility of considering these as well as other phytocystatins as therapeutics agents in anti-cancer strategies.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Classificação das proteases segundo o tipo de reação catalizada.....	2
<b>Figura 1.2:</b> Modelo de Schechter e Berger (1967).....	5
<b>Figura 1.3:</b> Estrutura tridimensional da papaína.....	7
<b>Figura 1.4:</b> Mecanismo catalítico das cisteíno proteases.....	8
<b>Figura 1.5:</b> Estruturas tridimensionais das cathepsinas B e L e da papaína.....	13
<b>Figura 1.6:</b> Etapas do processo de metástase.....	14
<b>Figura 1.7:</b> Esquema da interação entre a cistatina C humana e uma cisteíno protease do tipo papaína.....	22
<b>Figura 3.1:</b> Plasmídeo pTZ57R utilizado como vetor de propagação.....	31
<b>Figura 3.2:</b> Esquema da construção dos plasmídeos pET28a contendo os genes das cistatinas.....	33
<b>Figura 3.3:</b> Sistema pET de expressão de proteínas.....	35
<b>Figura 3.4:</b> Determinação da atividade enzimática e da constante de inibição $K_i$ app utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA.....	41
<b>Figura 3.5:</b> Cistatinas mutantes construídas a partir das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.....	42
<b>Figura 3.6:</b> Metodologia da mutagênese sítio-dirigida.....	45
<b>Figura 3.7:</b> Perfil de hidrofobicidade das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4...54	54
<b>Figura 3.8:</b> Peptídeos sinais identificados nas seqüências das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.....	55
<b>Figura 3.9:</b> Alinhamento das seqüências das proteínas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI4.....	56
<b>Figura 3.10:</b> Alinhamento entre a cistatina CaneCPI-2 e outras fitocistatinas.....	57
<b>Figura 3.11:</b> Alinhamento entre a cistatina CaneCPI-3 e outras fitocistatinas.....	58
<b>Figura 3.12:</b> Alinhamento entre a cistatina CaneCPI-4 e outras fitocistatinas.....	58
<b>Figura 3.13:</b> Esquema das estruturas secundária e terciária da orizacistatina (OCI).....	59

<b>Figura 3.14:</b> Predição da estrutura secundária das cistatinas da cana-de-açúcar.....	62
<b>Figura 3.15:</b> Amplificação das ORFs das cistatinas da cana-de-açúcar.....	63
<b>Figura 3.16:</b> Expressão heteróloga e purificação das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.....	66
<b>Figura 3.17:</b> Detecção das cistatinas recombinantes pelos anticorpos policlonais.....	67
<b>Figura 3.18:</b> Detecção das proteínas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 endógenas.....	68
<b>Figura 3.19:</b> Inibição das catepsinas B e L humanas pelas cistatinas recombinantes.....	69
<b>Figura 3.20:</b> Expressão heteróloga e purificação das formas mutantes das cistatinas.....	71
<b>Figura 3.21:</b> Inibição da catepsina B humana pelas formas mutantes das cistatinas.....	72
<b>Figura 3.22:</b> Estabilidade térmica das cistatinas da cana-de-açúcar recombinantes.....	73
<b>Figura 4.1:</b> Esquema da construção dos plasmídeos pcDNA3.1 contendo os genes das cistatinas.....	85
<b>Figura 4.2:</b> Inseto utilizado nos ensaios de migração celular.....	93
<b>Figura 4.3:</b> Inseto utilizado nos ensaios de invasão celular.....	95
<b>Figura 4.4:</b> Caracterização das células MDA-MB-231 estavelmente transfectadas com os genes das cistatinas da cana-de-açúcar.....	98
<b>Figura 4.5:</b> Inibição da atividade de cisteíno catepsinas das células MDA-MB-231 pelas cistatinas recombinantes.....	100
<b>Figura 4.6:</b> Invasão das células MDA-MB-231 transfectadas com os genes das cistatinas da cana-de-açúcar.....	102
<b>Figura 4.7:</b> Efeito das cistatinas da cana-de-açúcar recombinantes sobre a habilidade invasiva das células MDA-MB-231.....	103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1:</b> Seqüências dos <i>primers</i> utilizados no isolamento das ORFs CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.....	30
<b>Tabela 3.2:</b> Molde e <i>primers</i> utilizados na primeira amplificação para a obtenção das ORFs correspondentes aos mutantes CaneCPI-4 N2, CaneCPI-4 N3, CaneCPI-2 N4 e CaneCPI-3 N4.....	43
<b>Tabela 3.3:</b> <i>Primers</i> utilizados na segunda amplificação para a obtenção das ORFs correspondentes aos mutantes CaneCPI-4 N2, CaneCPI-4 N3, CaneCPI-2 N4 e CaneCPI-3 N4.....	44
<b>Tabela 3.4:</b> Tamanho das ORFs e massas moleculares das cistatinas.....	52
<b>Tabela 3.5:</b> Probabilidades de localização extracelular e de presença de peptídeo sinal nas cistatinas.....	52
<b>Tabela 3.6:</b> Identidade de seqüência de aminoácidos entre as cistatinas da cana-de-açúcar e cistatinas de outras espécies vegetais.....	57
<b>Tabela 3.7:</b> Análise <i>in silico</i> das cistatinas recombinantes.....	64
<b>Tabela 3.8:</b> Constantes de inibição aparente ( $K_i$ app) das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 contra as catepsinas B e L humanas.....	70
<b>Tabela 4.1:</b> Efeito das cistatinas da cana-de-açúcar na proliferação e adesão das células MDA-MB-231.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{m}$	micrômetro
$\lambda_{\text{em}}$	comprimento de onda de emissão
$\lambda_{\text{ex}}$	comprimento de onda de excitação
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
aa	aminoácido(s)
Abs	absorbância
BrEt	brometo de etídeo
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DO	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
E64	transepoxi-succinil-L-leucilamido-(4-guanidino)butano
FBS	soro fetal bovino
g	grama
h	hora
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobase
$K_i$	constante de inibição
$K_i \text{ app}$	constante de inibição aparente
M	molar
mA	miliampéres
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro

tRNA	RNA transportador
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
nm	nanômetros
nt	nucleotídeo(s)
ORF	<i>open reading frame</i> – fase aberta de leitura
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida sódio dodecil sulfato
U	unidade enzimática
UTR	<i>Untranslated region</i> - região não traduzida
UV	ultravioleta
V	volts
vs	versus
x	vezes
Z-FR-MCA	carbобенzoilcarbonil-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina

## SUMÁRIO

<b>SÚMULA CURRICULAR</b> .....	<b>I</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enzimas proteolíticas.....	1
1.1.1 Cisteíno proteases.....	5
1.1.1.1 Catepsinas B e L lisossomais.....	10
1.1.1.2 Cisteíno proteases e câncer.....	14
1.2 Cistatinas.....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3 CAPÍTULO 1</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1.1 Análises <i>in silico</i> das seqüências das cistatinas.....	29
3.1.2 Isolamento de ORFs que codificam as novas cistatinas da cana-de-açúcar.....	30
3.1.3 Construção dos plasmídeos de expressão.....	31
3.1.4 Expressão das cistatinas recombinantes.....	34
3.1.5 Purificação das cistatinas recombinantes.....	37
3.1.6 Produção de anticorpos policlonais contra as cistatinas recombinantes e ensaio de <i>Western blot</i> .....	38
3.1.7 Ensaio de inibição das catepsinas B e L humanas.....	40
3.1.8 Construção de formas mutantes das cistatinas e análise da atividade inibitória.....	42
3.1.9 Análise da estabilidade das cistatinas recombinantes.....	47
<b>3.2 RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
3.2.1 Análises <i>in silico</i> das seqüências das cistatinas.....	48
3.2.2 Amplificação das ORFs das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.....	63
3.2.3 Expressão heteróloga e purificação das cistatinas recombinantes.....	64
3.2.4 Detecção das cistatinas recombinantes e das cistatinas endógenas da cana-de-açúcar.....	66
3.2.5 Inibição das catepsinas B e L humanas pelas cistatinas recombinantes.....	68
3.2.6 Atividade inibitória das formas mutantes das cistatinas.....	70

3.2.7 Estabilidade das cistatinas recombinantes.....	73
<b>3.3 DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>4 CAPÍTULO 2.....</b>	<b>82</b>
<b>4.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>84</b>
4.1.1 Obtenção de células MDA-MB-231 superexpressando as cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 ou CaneCPI-4.....	84
4.1.1.1 Construção dos plasmídeos de expressão.....	84
4.1.1.2 Transfecção das células MDA-MB-231.....	86
4.1.1.3 Análise da expressão das cistatinas nos clones estáveis por RT-PCR.....	88
4.1.1.4 Análise da expressão das cistatinas nos clones estáveis por <i>Western blot</i> .....	88
4.1.2 Medida da atividade de cisteíno catepsinas intra e extracelular das células MDA-MB-231.....	89
4.1.3 Ensaio de proliferação celular.....	91
4.1.4 Ensaio de adesão celular.....	92
4.1.5 Ensaio de migração celular.....	93
4.1.6 Ensaio de invasão celular.....	94
<b>4.2 RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
4.2.1 Caracterização dos clones estáveis expressando as cistatinas da cana-de-açúcar.....	97
4.2.2 Inibição da atividade de cisteíno catepsinas das células MDA-MB-231.....	98
4.2.3 Efeito das cistatinas da cana-de-açúcar na proliferação e adesão das células MDA-MB-231.....	101
4.2.4 Efeito das cistatinas da cana-de-açúcar na migração e invasão das células MDA-MB-231.....	102
<b>4.3 DISCUSSÃO.....</b>	<b>105</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>110</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>

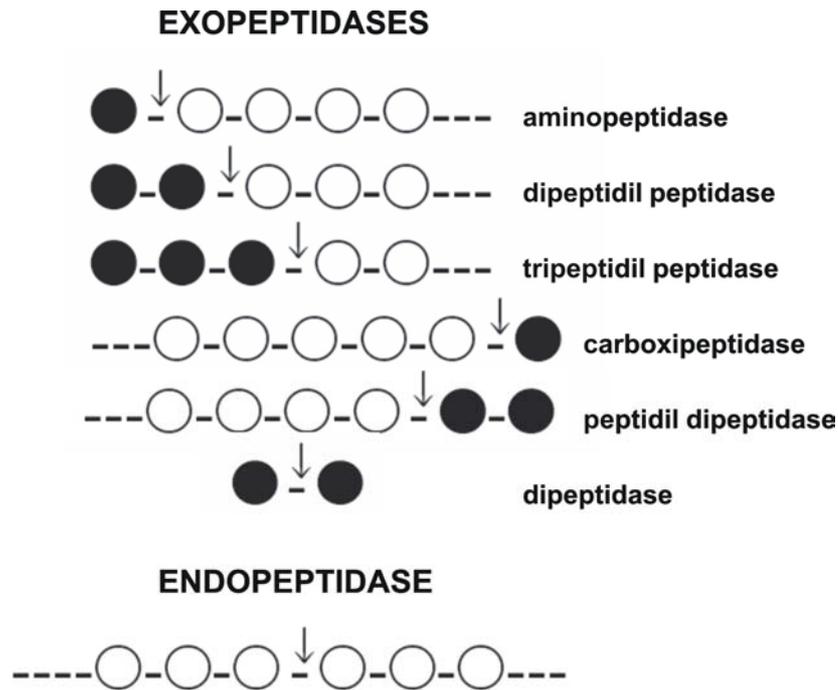
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases ou peptidases, são proteínas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em outras proteínas. Estas enzimas estão envolvidas em várias funções biológicas, participando de numerosos processos bioquímicos e fisiológicos, tais como digestão de alimentos, coagulação sangüínea e fibrinólise, ativação de proenzimas, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, ativação do sistema do complemento, e processos de inflamação, entre outros (Leung-Toung *et al*, 2002). Embora as proteases sejam fundamentais para o metabolismo celular, elas podem também estar envolvidas em processos patológicos devido à atividade enzimática desregulada.

As proteases são consideradas enzimas ubíquas, já que realizam uma variedade de funções essenciais para todos os organismos. Genes de proteases são encontrados nos genomas de todos os organismos além de vários tipos de vírus, sendo responsáveis por aproximadamente 2% do produto gênico total distribuído em compartimentos celulares e teciduais (Barrett, 1987).

As proteases são classificadas em exopeptidases e endopeptidases de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia polipeptídica (**Figura 1.1**). As exopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas próximas à extremidade C-terminal, liberando um único resíduo (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil dipeptidases), ou próximas à extremidade N-terminal, liberando um único resíduo (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil peptidases). As endopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas internas em proteínas e polipeptídeos (Barrett, 1994).



**Figura 1.1: Classificação das proteases segundo o tipo de reação catalizada.** ○ resíduos de aminoácidos; ● resíduos de aminoácidos liberados após a proteólise.

Outro critério utilizado na classificação das proteases baseia-se nos resíduos de aminoácidos posicionados no sítio ativo da enzima, os quais são responsáveis pelo mecanismo catalítico. Dessa forma, as proteases são agrupadas em seis classes principais: serino proteases, cisteíno proteases, aspartil proteases, metalo proteases, treonino proteases e glutamil proteases (Rawlings *et al*, 2006).

As seis classes de proteases podem ser divididas de acordo com o mecanismo catalítico. As serino, as cisteíno e as treonino proteases possuem aminoácidos fortemente nucleofílicos em seu sítio catalítico os quais geralmente são alinhados com aminoácidos que atuam como bases doadoras de prótons. O mecanismo catalítico destas enzimas envolve a formação de um intermediário covalente entre a enzima e um fragmento do substrato (catálise covalente). Por outro lado, na catálise das aspartil, metalo e glutamil proteases, não ocorre o ataque nucleofílico por um grupo funcional da enzima, sendo o nucleófilo neste caso, uma

molécula de água ativada, e não havendo, portanto, a formação de um intermediário covalente (catálise ácido-base). Neste tipo de catálise um resíduo de ácido aspártico ou ácido glutâmico e o zinco atuam como ácidos e bases (Beynon e Bond, 1989; Barrett *et al*, 2004; Rawlings *et al*, 2006).

A classe das serino proteases compreende duas famílias distintas, a família quimotripsina que inclui as enzimas de mamíferos como tripsina, quimotripsina, elastase e kalikreínas, e a família subtilisina que inclui enzimas bacterianas como a subtilisina. Embora as estruturas tridimensionais características das duas famílias sejam distintas, a geometria do sítio ativo de ambas é semelhante e a catálise ocorre através do mesmo mecanismo. Três resíduos de aminoácidos formam a tríade catalítica essencial para a atividade da enzima: um resíduo de serina (nucleófilo), um resíduo de histidina (base doadora de prótons) e um resíduo de ácido aspártico (orienta a histidina) (Beynon e Bond, 1989; Barrett *et al*, 2004).

As cisteíno proteases incluem as proteases de plantas como a papaína e a bromelaína, várias catepsinas lisossomais de mamíferos, as calpaínas citosólicas bem como várias proteases de parasitas. São enzimas que possuem em seu sítio ativo um resíduo de cisteína e um resíduo de histidina, essenciais para a atividade proteolítica, com funções semelhantes aos resíduos de serina e histidina nas serino proteases. Em algumas enzimas, um terceiro resíduo (asparagina) orienta o resíduo de histidina (Beynon e Bond, 1989; Barrett *et al*, 2004).

A maioria das aspartil proteases pertence à família pepsina, a qual inclui enzimas digestivas como a pepsina e a quimosina, a catepsina D lisossomal, e algumas proteases de fungos. Uma segunda família compreende proteases virais como a protease do vírus da AIDS. Estas enzimas são moléculas bilobadas sendo

que cada lobo possui um resíduo de ácido aspártico formando a díade catalítica no sítio ativo localizado entre os dois lobos (Beynon e Bond, 1989; Barrett *et al*, 2004).

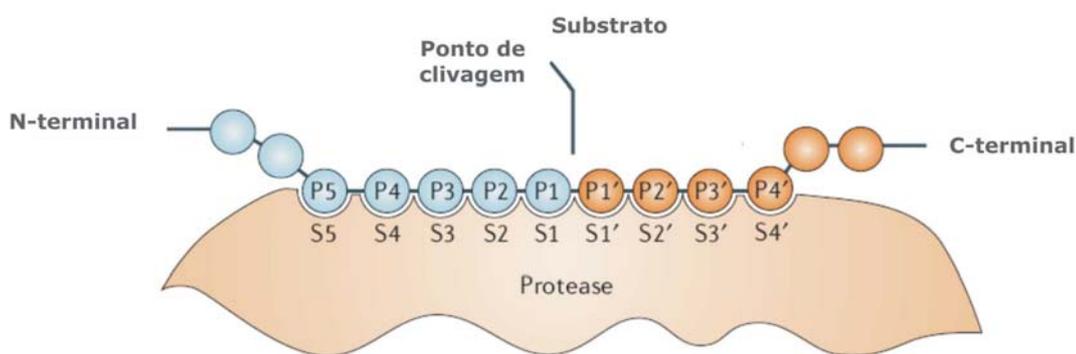
As metalo proteases são enzimas encontradas desde bactérias e fungos até organismos superiores. A atividade catalítica destas enzimas depende da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio ativo (Beynon e Bond, 1989; Barrett *et al*, 2004).

As treonino e as glutamil proteases não haviam sido descritas até 1995 e 2004, respectivamente. As treonino proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de treonina em seu sítio ativo, o qual possui o nucleófilo (grupo hidroxila) e a base (grupo amino). Os membros desta classe de enzimas constituem as subunidades catalíticas do proteossomo, o qual está envolvido no *turnover* intracelular de proteínas. Estas proteases são encontradas em vírus, bactérias, fungos, plantas e animais (Barrett *et al*, 2004; Rawlings *et al*, 2006).

Previamente classificadas como aspartil proteases, as glutamil proteases foram recentemente re-classificadas como um sexto tipo catalítico de proteases. A distribuição destas enzimas é limitada aos fungos filamentosos, sendo o único tipo de proteases não encontrado em mamíferos. A atividade proteolítica dos membros desta classe depende de uma díade catalítica que consiste dos resíduos ácido glutâmico e glutamina, os quais ativam a água nucleofílica e estabilizam o intermediário tetraédrico, respectivamente, durante a catálise (Fujinaga *et al*, 2004; Sims *et al*, 2004; Rawlings *et al*, 2006).

Para descrever a especificidade de todas as classes de proteases, utiliza-se o modelo desenvolvido por Schechter e Berger (1967). De acordo com este modelo, os subsítios da enzima (designados pela letra "S") são locais onde os resíduos de aminoácidos do substrato (designados pela letra "P") se ligam ao sítio ativo, sendo

que cada subsítio acomoda um único resíduo de aminoácido (**Figura 1.2**). Os resíduos posicionados ao lado da ligação peptídica a ser clivada são numerados P1, P2, P3... em direção ao N-terminal do substrato, e P1', P2', P3'... em direção ao C-terminal. Assim, P1 e P1' são os resíduos que formam a ligação peptídica a ser clivada no substrato. Similarmente, ...S3, S2, S1, S1', S2', S3'... são usados para designar os subsítios da protease que acomodam os resíduos do substrato correspondentes.

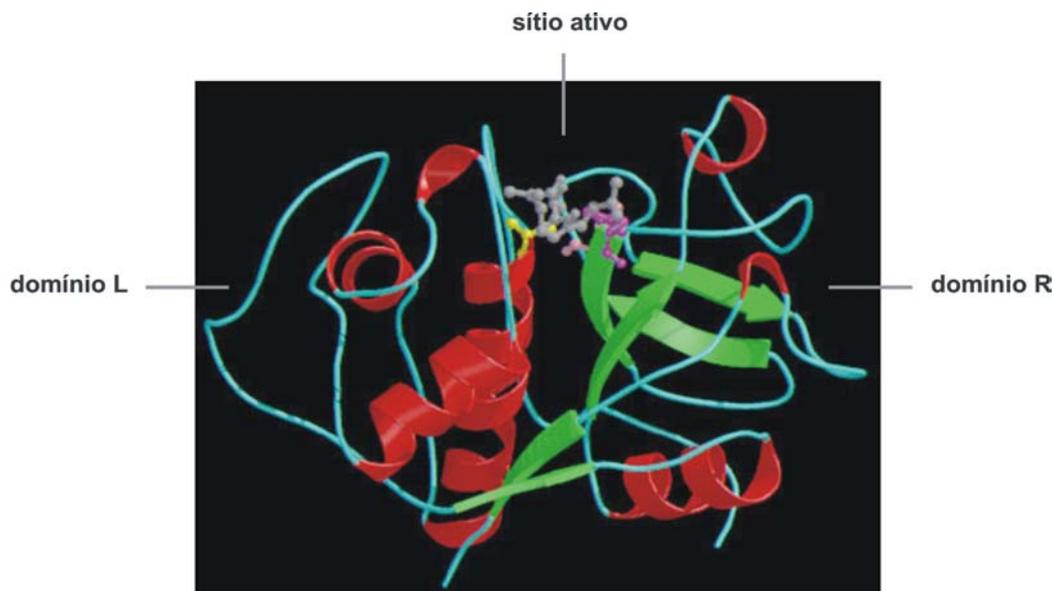


**Figura 1.2: Modelo de Schechter e Berger (1967).** Modelo utilizado para descrever a interação de uma protease com o substrato protéico. Adaptado de Turk, 2006.

### 1.1.1 Cisteíno proteases

As cisteíno proteases compreendem um complexo grupo de enzimas de variadas propriedades físicas e bioquímicas, distribuídas em 44 famílias (Rawlings e Barrett, 1994; Rawlings *et al*, 2006). Dentre estas, a família C1, denominada família da papaína, é a família de cisteíno proteases mais bem caracterizada até hoje. A papaína, que dá o nome à família, é extraída do látex de *Carica papaya* e foi a primeira enzima da família a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios X, tornando-se assim, o membro mais estudado da família. Enzimas que apresentam características semelhantes às enzimas desta família são descritas como “*papain-like*” (do tipo papaína).

As cisteíno proteases da família C1 podem ser encontradas em plantas e animais assim como em vírus e procariotos. Em eucariotos, as enzimas são sintetizadas como preproenzimas, as quais podem ser divididas em três partes: um peptídeo sinal N-terminal (10 a 20 aminoácidos), um pró-peptídeo (38 a 250 aminoácidos) e a seqüência que corresponde à enzima madura (220 a 260 aminoácidos) (Wiederanders, 2003). A estrutura terciária da enzima madura (**Figura 1.3**) apresenta forma bilobada, consistindo de um domínio L (*left (L-)domain*), que compreende principalmente três  $\alpha$ -hélices da metade N-terminal, e um domínio R (*right (R-)domain*), que compreende um motivo barril- $\beta$  da metade C-terminal da molécula. O sítio catalítico é localizado em uma fenda entre os dois lobos, estando a cisteína catalítica no domínio L e a histidina no domínio R (McGrath, 1999). Na maioria das enzimas deste grupo, esta estrutura é estabilizada por três pontes dissulfeto, duas no domínio L e uma no domínio R. Estruturalmente, as enzimas da família C1 são similares quanto ao número e posição de  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ , e a maioria das mutações entre as proteínas ocorre nos *loops* e *turns* que ligam esses elementos, o que é consistente com uma ancestralidade comum.



**Figura 1.3: Estrutura tridimensional da papaína.** A estrutura mostra os dois domínios separados pela fenda do sítio ativo. O domínio N-terminal consiste principalmente de  $\alpha$ -hélices, enquanto o domínio C-terminal contém um barril- $\beta$ . Os resíduos catalíticos são mostrados na representação *ball-and-stick*: Cys em amarelo, His em roxo e Asn em rosa. O inibidor de cisteína proteases E-64 é mostrado em cinza na mesma representação. Fonte: base de dados MEROPS (Rawlings *et al*, 2006).

O mecanismo catalítico das cisteína proteases é caracterizado pela formação de um intermediário tetraédrico covalente, a acil-enzima, resultante do ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína do sítio ativo (Cys25 na numeração da papaína) sobre a carbonila da ligação peptídica que será hidrolisada. O grupo imidazol da cadeia lateral da histidina (His159) atua comoceptor de hidrogênio na catálise. A asparagina (Asn175) participa orientando o anel imidazólico da histidina. A **figura 1.4** mostra o esquema do mecanismo catalítico das cisteína proteases. O ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína sobre o carbono da carbonila da ligação peptídica a ser hidrolizada gera um intermediário tetraédrico covalente entre a enzima e o substrato. Por uma reação de acilação, a porção C-terminal do substrato é liberada, deixando a enzima acilada. Em seguida, em uma reação de deacilação, a acil-enzima reage com uma molécula de água liberando a parte N-terminal do

substrato e a enzima (Beynon e Bond, 1989; Storer e Ménard, 1994; Barrett *et al*, 2004).

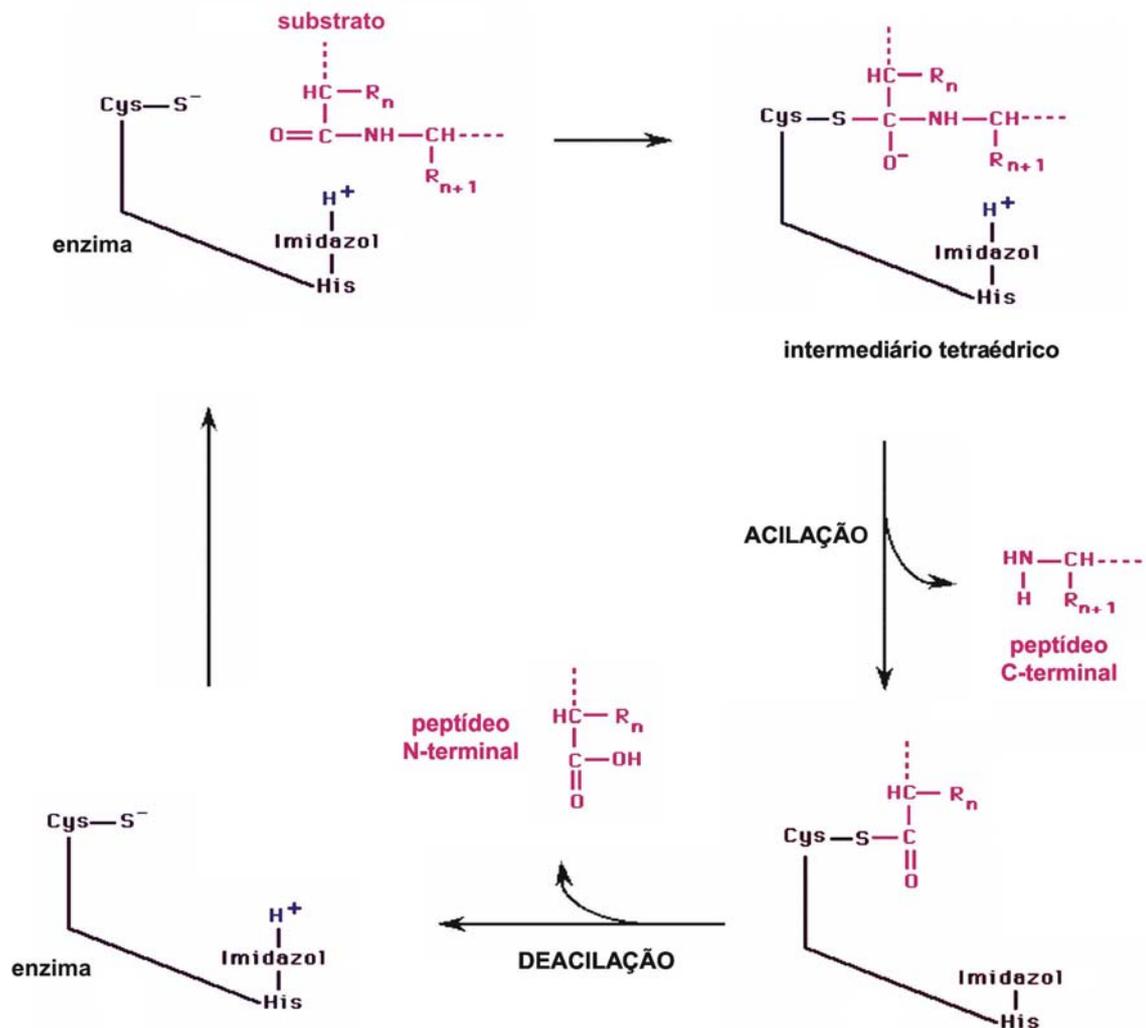


Figura 1.4: Mecanismo catalítico das cisteíno proteases.

As cisteíno proteases estão envolvidas em diversas funções em todos os organismos. Certos vírus codificam suas proteínas na forma de um único polipeptídeo precursor que é clivado em pontos específicos por uma cisteíno

protease, a qual também é liberada a partir da poliproteína precursora por autocatálise, para gerar os produtos isolados.

Em organismos parasitas de animais e plantas, como bactérias, fungos, protozoários e vermes, as cisteíno proteases estão envolvidas em processos de patogenicidade, tais como, invasão celular e tecidual, imunoevasão através da degradação de proteínas envolvidas na defesa do hospedeiro e obtenção de aminoácidos essenciais para seu crescimento e desenvolvimento (Valueva *et al*, 2004; Sajid e McKerrow, 2002). Estas enzimas têm sido identificadas em bactérias como *Streptococcus aureus* (estreptopaína), *Clostridium histolyticum* (clostripaína), *Porphyromonas gingivalis* (gingipaína); em fungos como *Aspergillus flavus* (protease do tipo catepsina B); em protozoários como *Trypanosoma cruzi* (cruzaína), *Trichomonas vaginalis* (23 cisteíno proteases), *Plasmodium falciparum* (falcipaína); e em vermes como *Schistosoma mansoni* (cisteíno proteases envolvidas na degradação de hemoglobina do hospedeiro) (Otto e Schirmeister, 1997). Em nosso laboratório tem sido caracterizada uma cisteíno protease da bactéria *Xylella fastidiosa* (Xylellaina), agente causador da Clorose Variegada do Citros, possivelmente envolvida na sua patogenicidade (Nogaroto *et al*, 2006).

Cisteíno proteases de plantas são encontradas nos vacúolos e são responsáveis pela mobilização de proteínas estocadas no endosperma durante a germinação das sementes (Arai *et al*, 2002); elas são também encontradas no meio extracelular, tais como aquelas de papaia e figo (Rawlings e Barrett, 1994). Já em invertebrados, tais como insetos e nematóides, as cisteíno proteases estão entre as enzimas digestivas (Pernas *et al*, 1998).

Em vertebrados, as cisteíno proteases têm a função primária de degradar, de forma não seletiva, proteínas dentro dos lisossomos. No entanto, recentemente ficou

demonstrado que muitas destas enzimas não são estritamente encontradas nos lisossomos, podendo acumular-se em diferentes organelas e participar de processos celulares mais especializados, levando a processos patológicos. As cisteíno proteases mais importantes em mamíferos são as calpaínas citosólicas (cisteíno proteases ativadas por íons de cálcio) da família C2 (família da calpaína) e as catepsinas lisossomais (catepsinas B, C, H, K, L, M, N, S, T, V e W) da família C1 (família da papaína).

A função das calpaínas nos organismos ainda é pouco conhecida, porém é sugerida sua participação em processos patológicos como a degradação muscular que ocorre na Distrofia Muscular de Duchenne, os processos que originam artrite e catarata, e a proteólise da agreguina que promove a agregação plaquetária característica da trombose (Wang e Yuen, 1994).

As catepsinas lisossomais pertencentes à família da papaína exercem importantes funções em muitos processos fisiológicos tais como processamento proteolítico de pró-hormônios e pró-enzimas, degradação de proteínas e apresentação de antígenos, entre outros. Tais enzimas também estão envolvidas em várias condições patológicas como processos inflamatórios, Doença de Alzheimer, osteoporose e invasão tumoral e metástase (Otto e Schirmeister, 1997; Abrahamson, 1993; Vasiljeva *et al*, 2007).

#### **1.1.1.1 Catepsinas B e L lisossomais**

As catepsinas B e L são enzimas lisossomais encontradas na maioria das células e tecidos de mamíferos e funcionam principalmente na degradação intracelular de proteínas. Em determinadas circunstâncias, no entanto, elas podem ser liberadas e agir extracelularmente degradando componentes da matriz

extracelular, tais como, proteoglicanas, laminina e colágeno, entre outros (Dickinson, 2002).

Estas enzimas são sintetizadas como precursores inativos (preproenzimas) e transportadas para o lúmen do retículo endoplasmático, onde o peptídeo sinal é removido. O propeptídeo confere estabilidade e facilita o enovelamento apropriado da proteína. No complexo de Golgi as proenzimas são posteriormente modificadas por glicosilação, formação das pontes dissulfeto e fosforilação de resíduos de manose, modificação pós-traducional necessária para o endereçamento aos lisossomos.

Após a síntese e durante o transporte intracelular da proenzima, esta permanece inativa. O propeptídeo, localizado na superfície da enzima, bloqueia a fenda do sítio ativo em uma orientação oposta àquela requerida para a hidrólise do substrato. Uma vez no lisossomo, a proenzima é ativada através da clivagem e dissociação do propeptídeo. A ativação pode ocorrer através da autocatálise ou pela atividade de outras catepsinas presentes nos lisossomos. Ainda, as procatepsinas podem ser ativadas por outras proteases na matriz extracelular (Wiederanders, 2003).

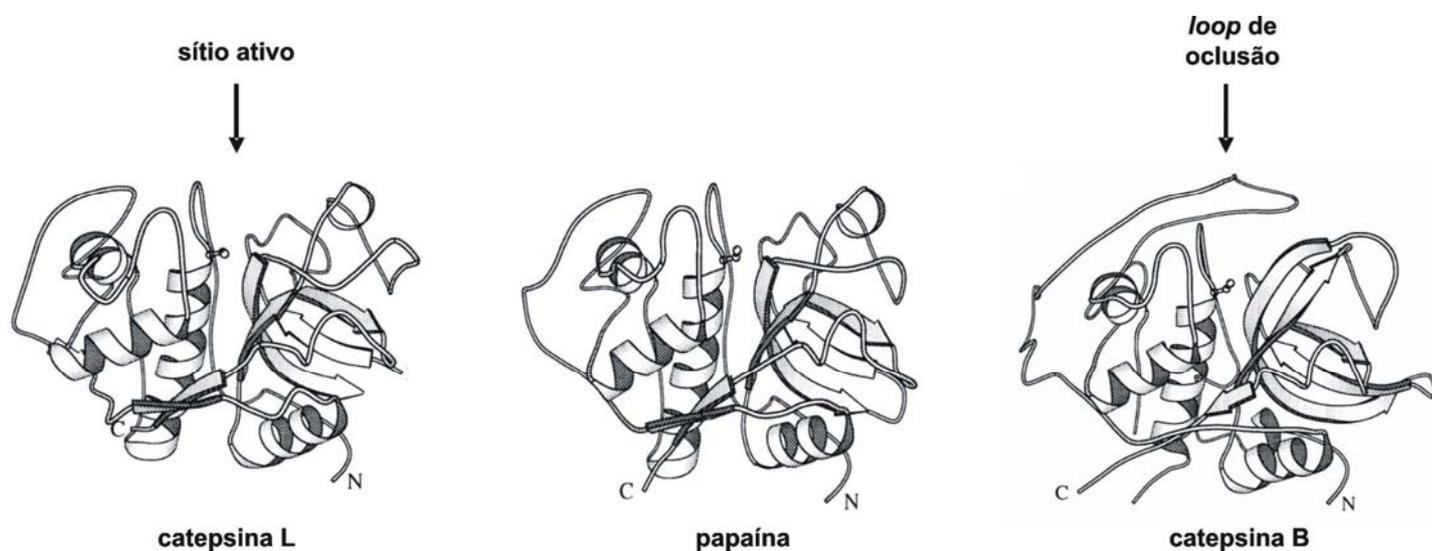
Com base na homologia de seqüências e nas estruturas tridimensionais, as enzimas de mamíferos da família da papaína são subdivididas em duas subfamílias, sendo designadas como enzimas do tipo catepsina L (*cathepsin L-like*) ou enzimas do tipo catepsina B (*cathepsin B-like*). Elas diferem principalmente quanto à presença de um segmento peptídico adicional na estrutura da catepsina B e quanto à especificidade ao substrato, que na família da papaína é determinada principalmente pelo subsítio S2 (Coulombe *et al*, 1996; Fujishima *et al*, 1997).

A catepsina B foi a primeira catepsina lisossomal a ser descrita, sendo a melhor estudada dentre as cisteíno proteases de mamíferos. Características funcionais e estruturais diferenciam a catepsina B da catepsina L, e de outras cisteíno proteases de plantas, fungos, parasitas, etc.

A catepsina B tem preferência por resíduos hidrofóbicos na posição P2 do substrato e é a única enzima que aceita um resíduo de arginina nesta posição, devido à presença de um resíduo de ácido glutâmico (Glu245) no subsítio S2 (Barrett *et al*, 2004). Além da atividade de endopeptidase, a catepsina B possui também a atividade de exopeptidase (Krupa *et al*, 2002; Cezari *et al*, 2002, Cotrin *et al*, 2004). Como um membro da família da papaína, a catepsina B apresenta similaridade de seqüência com a papaína e com outras enzimas da família. Entretanto, conforme pode ser observado na **figura 1.5**, a estrutura da catepsina B difere quanto à presença de um segmento peptídico de aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos, denominado *loop* de oclusão (*“occluding loop”*), que bloqueia a fenda do sítio ativo da enzima (Musil *et al*, 1991). Dentro deste segmento, dois resíduos de histidinas, His110 e His111, posicionados sobre a região dos subsítios S', estabilizam o carboxilato C-terminal do substrato, posicionando a ligação peptídica a ser clivada dois resíduos a partir do C-terminal e contribuindo assim para a atividade peptidil dipeptidase da enzima (Illy *et al*, 1997).

A presença do *loop* de oclusão na catepsina B madura é incompatível com a inibição por membros da família cistatina, inibidores protéicos reversíveis de cisteíno proteases, uma vez que estes se ligam em ambos os subsítios S e S' da enzima (Illy *et al*, 1997). A inibição só é possível através de um mecanismo de dois passos, o qual requer um deslocamento do *loop* de oclusão antes da ligação à fenda do sítio ativo (Nycander *et al*, 1998; Pavlova *et al*, 2000). Conseqüentemente, a maioria dos

inibidores naturais de cisteíno proteases é muito menos efetiva contra catepsina B do que contra outros membros da família da papaína.



**Figura 1.5: Estruturas tridimensionais das catepsinas B e L e da papaína.** A figura mostra a presença de um segmento peptídico adicional (*loop* de oclusão) na estrutura da catepsina B, o que a diferencia das outras cisteíno proteases da família da papaína. N e C representam as extremidades N-terminal e C-terminal das proteínas. O resíduo de cisteína do sítio ativo é mostrado na representação *ball-and-stick*. Adaptado de Fujishima *et al*, 1997.

A catepsina L atua principalmente como endopeptidase, clivando preferencialmente ligações peptídicas de substratos com resíduos aromáticos em P2 (Fujishima *et al*, 1997). A estrutura tridimensional da procatepsina L revelou que o propeptídeo estabelece interações hidrofóbicas com a superfície da região correspondente à enzima madura e com a fenda do sítio ativo. Os subsítios S1 a S3 são ocupados pelo propeptídeo, porém em uma orientação oposta àquela de um substrato (Coulombe *et al*, 1996). Uma vez que a catepsina L madura não apresenta o *loop* de oclusão característico da catepsina B, inibidores protéicos da família cistatina, os quais se ligam ao sítio ativo da enzima, têm uma alta afinidade pela catepsina L, apresentando valores de  $K_i$  da ordem de nM a pM.

### 1.1.1.2 Cisteíno proteases e câncer

A progressão da metástase ainda é um dos maiores desafios para o desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento do câncer. De fato, a maior causa de morte dentre os pacientes com câncer não ocorre apenas pela presença de um tumor primário, mas principalmente quando há a formação de metástases do tumor em sítios secundários do organismo. Conforme esquematizado na **figura 1.6**, a metástase é um processo complexo que consiste de várias etapas que levam ao espalhamento das células tumorais a novas localizações, geralmente distantes do local onde se estabeleceu a massa tumoral primária.

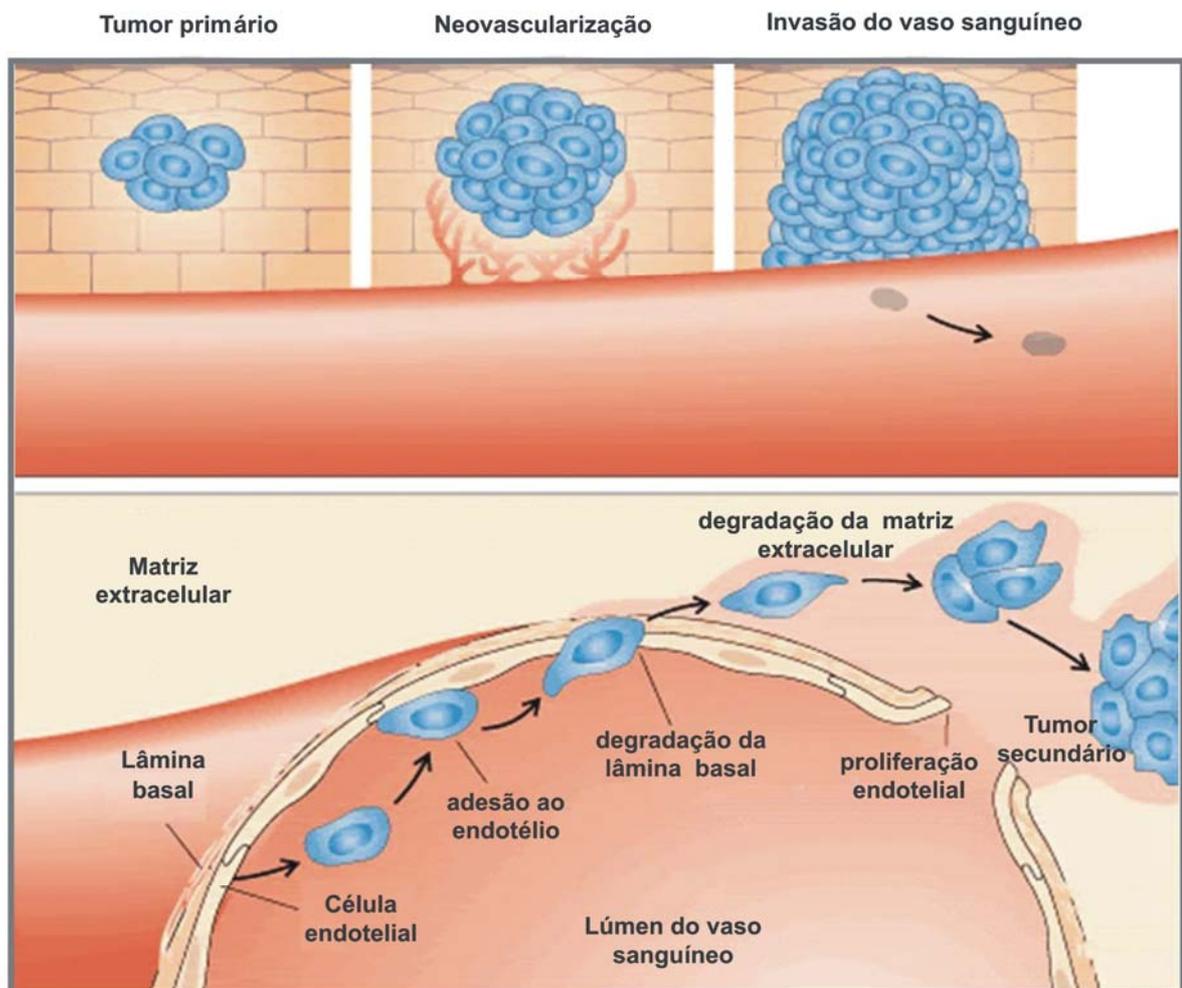


Figura 1.6: Etapas do processo de metástase.

As células tumorais do foco primário proliferam de forma desregulada formando um tumor sólido primário, o qual será nutrido pela formação de novos vasos sanguíneos (neovascularização ou angiogênese). Além de fornecer nutrientes e oxigênio ao tumor, os novos vasos constituem um caminho de escape mais acessível para as células metastáticas. Estas células se desprendem da massa tumoral e, degradando a lâmina basal dos vasos sanguíneos, invadem a corrente sanguínea. As células, então, são levadas com o fluxo de sangue, e em um local indeterminado elas se aderem às células endoteliais da parede interna dos vasos e invadem novamente a lâmina basal destes, atingindo agora a matriz extracelular. Mais tarde, as células degradam os componentes da matriz extracelular, migrando e invadindo através desta até se estabelecerem em um foco secundário, onde proliferam formando uma nova massa tumoral. Porém, é necessário ressaltar que aproximadamente uma em 10.000 células que escapam do tumor primário chega a colonizar outro tecido e formar um tumor secundário metastático (Alberts *et al*, 2004). Dentre as diferentes etapas, a degradação e invasão da lâmina basal e da matriz extracelular constituem os passos chave na cascata metastática das células tumorais.

A matriz extracelular constitui o espaço extracelular, ou tecido conjuntivo, da maioria dos tecidos dos vertebrados. Esta matriz é composta principalmente por duas classes de macromoléculas: os glicosaminoglicanos, cadeias de polissacarídeos covalentemente ligadas a proteínas formando proteoglicanos, e as proteínas fibrosas, que incluem o colágeno, a elastina, a fibronectina e a laminina, entre outros, as quais exercem funções adesivas e estruturais. No tecido conjuntivo, as moléculas de proteoglicanos formam uma substância semelhante a um gel, altamente hidratada, na qual estão embebidas as fibras protéicas. Desta forma, a

matriz extracelular determina as propriedades físicas dos tecidos. O gel de polissacarídeos permite que a matriz suporte forças de compressão, enquanto as fibras colágenas resistem às forças de distensão. A elastina confere elasticidade aos tecidos e a fibronectina auxilia a ligação das células à matriz. Estas macromoléculas são secretadas principalmente pelos fibroblastos encontrados na matriz (Alberts *et al*, 2004).

A lâmina basal é uma camada fina (40 a 120 nm de espessura) e flexível de matriz extracelular especializada, localizada principalmente ao redor de vasos sanguíneos e subjacente às camadas de células epiteliais. Também pode ser encontrada ao redor de células musculares e adiposas e nos glomérulos renais. A maioria das lâminas basais é constituída por colágeno tipo IV, o proteoglicano sulfato de heparan, e as glicoproteínas laminina e entactina. A lâmina basal é sintetizada pelas células que repousam sobre ela. Além de funções estruturais e filtrantes, as lâminas basais determinam a polaridade celular, influenciam o metabolismo celular, auxiliam na regeneração tecidual, promovem a proliferação e a diferenciação celular e também atuam como vias para a migração celular (Alberts *et al*, 2004).

A invasão da lâmina basal e da matriz extracelular depende, portanto, da atividade de enzimas proteolíticas de diferentes classes, as quais podem atuar diretamente degradando laminina, elastina e colágeno, entre outros, ou indiretamente, ativando outras proteases, as quais então degradam tais componentes. Estas enzimas incluem aspartil proteases (catepsina D) e cisteíno proteases (principalmente catepsinas B e L), envolvidas principalmente em proteólise intracelular dentro de lisossomos, além de serino proteases (plasmina e

ativador de plasminogênio tipo uroquinase - uPA = *urokinase-type plasminogen activator*) e metalo proteases de matriz, responsáveis por proteólise extracelular.

Como as proteases exercem sua ação sobre outras proteases, elas atuam em uma seqüência específica determinada pela ordem de sua ativação, resultando em uma cascata de proteólise. Nesse sentido, a seguinte seqüência proteolítica tem sido sugerida: a aspartil protease catepsina D ativa cisteíno proteases, como por exemplo, a catepsina B, a qual ativa pro-uPA; o uPA ativo pode então converter plasminogênio em plasmina; finalmente, a catepsina B e a plasmina são capazes de degradar vários componentes da matriz extracelular, assim como ativar zimógenos de metalo proteases de matriz, a principal família de proteases que degradam a matriz extracelular (Mohamed e Sloane, 2006; Skrzydlewska *et al*, 2005).

Outras cisteíno proteases lisossomais como as catepsinas B, L, S, K, V e X são potencialmente capazes de degradar componentes da lâmina basal e da matriz extracelular. Dentre estas, as catepsinas B e L têm sido investigadas mais extensivamente devido ao seu importante envolvimento na progressão do câncer.

Estudos têm revelado que as quantidades de mRNA e proteína e a atividade das catepsinas B e L em linhagens de células cancerosas, especialmente aquelas com potencial metastático mais alto, estão consideravelmente aumentados. Zajc e colaboradores verificaram que o nível e a atividade das catepsinas B e L estavam altamente correlacionados e aumentavam progressivamente com a tumorigenicidade das linhagens celulares de carcinoma mamário humano (Zajc *et al*, 2003; Zajc *et al*, 2002). Ainda, tem sido sugerido que a maior produção e a liberação destas catepsinas em células tumorais resultam na invasão celular e metástase. A expressão intracelular de ribozimas contra mRNA de catepsina B foi capaz de diminuir os níveis de mRNA e proteína e a atividade da catepsina B, resultando na

redução da migração e invasão de células de carcinoma oral (Wickramasinghe *et al*, 2005).

Embora menos estudada do que a catepsina B, a catepsina L também tem sido associada à invasão tumoral e metástase. A transfecção de cDNA *antisense* para a catepsina B ou L em uma linhagem celular de osteosarcoma humano resultou na diminuição da capacidade invasiva e da motilidade da célula tumoral (Krueger *et al*, 1999; Krueger *et al*, 2001). A expressão de transcritos *antisense* para a catepsina L na linhagem celular de melanoma B16F10 resultou em níveis e atividade da enzima reduzidos, o que contribuiu para a diminuição da habilidade de migração e invasão celular (Yang e Cox, 2007). Outros estudos, utilizando inibidores exógenos de proteases, evidenciaram o envolvimento das catepsinas B e L com o potencial invasivo de várias linhagens celulares tumorais de diferentes origens (Kolkhorst *et al*, 1998; Colella *et al*, 2004).

Em células normais, a biosíntese das catepsinas é regulada em diferentes níveis, incluindo transcrição e processamento dos mRNAs, tradução, processamento pós-traducional e localização subcelular, mantendo assim o correto funcionamento no metabolismo celular. Além dos controles que determinam o nível de expressão destas enzimas, vários mecanismos são utilizados para regular a atividade das catepsinas. Muitas delas são sintetizadas como zimógenos inativos que devem ser ativados por clivagem proteolítica, o que pode ocorrer por um processo autocatalítico sob condições específicas como pH baixo. A liberação das proteases de uma célula é geralmente um processo controlado; as cisteíno proteases são inativadas por oxidação do resíduo de cisteína do sítio ativo, e requerem um ambiente redutor para sua atividade. Muitas cisteíno proteases humanas são instáveis em pH neutro, e

requerem um pH ácido para a sua ação. Por último, uma vez ativada, a atividade da enzima pode ser perdida por degradação (Dickinson, 2002).

Em células tumorais, a falta de regulação das catepsinas em um ou mais destes níveis pode resultar em um aumento nas quantidades de mRNA e proteína, maior atividade, e distribuição intracelular alterada (Roshy *et al*, 2003; Sloane *et al*, 1994; Mohamed and Sloane, 2006). Porém, esse aumento na atividade das catepsinas não é apenas consequência do aumento no nível de expressão de tais enzimas, mas também da redução na regulação por inibidores endógenos, cuja atividade e concentração encontram-se significativamente reduzidas nas células cancerosas (Skrzydowska *et al*, 2005).

A presença de inibidores protéicos específicos que se ligam firmemente à enzima impedindo a ligação desta ao substrato, constitui o principal controle da atividade das cisteíno proteases. Estes inibidores, conhecidos como cistatinas, atuam intra e extracelularmente formando complexos com as enzimas alvos, mantendo assim, um equilíbrio apropriado entre a enzima livre e seus complexos. A manutenção deste equilíbrio é crítica se considerarmos que a hidrólise de ligações peptídicas é um processo essencialmente irreversível. Vários estudos sugerem que o desequilíbrio entre a expressão e/ou atividade das catepsinas e seus respectivos inibidores endógenos está associado ao desenvolvimento do fenótipo invasivo e metastático da célula tumoral (Ervin e Cox, 2005; Shridhar *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2004; Li *et al*, 2005).

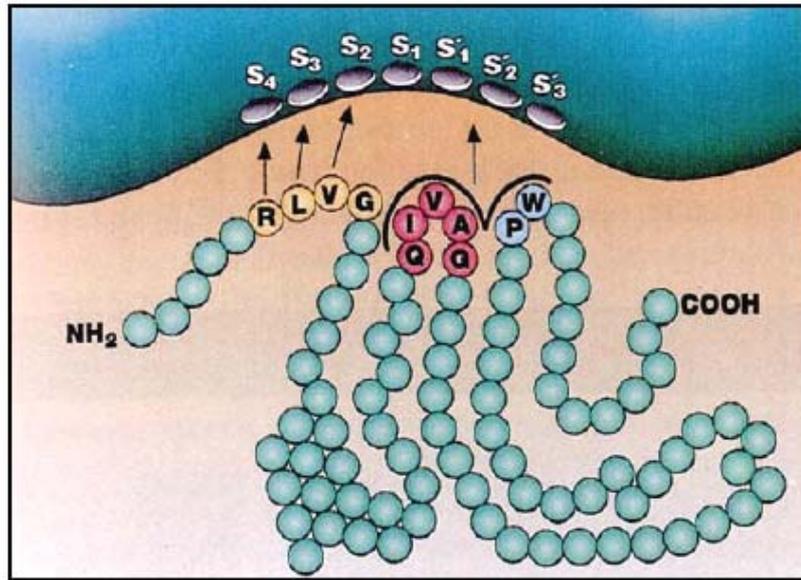
O silenciamento da expressão de cistatina M através da tecnologia de siRNA em uma linhagem celular de câncer oral metastático resultou em um aumento na migração e invasão celular como consequência da maior atividade enzimática das cisteíno proteases catepsinas B e L (Vigneswaran *et al*, 2006). A comparação dos

níveis de expressão da catepsina L e seus inibidores endógenos, estefinas A e B, em relação à tumorigenicidade de linhagens celulares de câncer de mama humano, sugere que o desequilíbrio entre a catepsina L e as estefinas contribui para o desenvolvimento de um fenótipo celular maligno (Zajc *et al*, 2002). Luo e colaboradores verificaram que o nível de estefina A era seis a sete vezes menor e o nível de catepsina B era três vezes maior em células de carcinoma escamoso esofágico em relação às células normais (Luo *et al*, 2004). Superexpressando a cistatina M, a estefina A e a cistatina do ovo de galinha em linhagens celulares de carcinoma mamário humano, carcinoma escamoso esofágico e de câncer de próstata, respectivamente, atenuou-se o desequilíbrio entre as cisteíno proteases e os inibidores, e conseqüentemente, o potencial invasivo dessas linhagens celulares (Shridhar *et al*, 2004; Li *et al*, 2005; Colella e Casey, 2003). A adição de cistatina de ovo de galinha em tecidos de câncer gástrico também foi capaz de restabelecer o equilíbrio entre as cisteíno proteases e os inibidores, reduzindo as atividades das catepsinas B e L àqueles valores encontrados nas células normais (Saleh *et al*, 2003).

Assim, uma diminuição da concentração das cistatinas resulta no aumento da atividade das catepsinas, gerando um desequilíbrio que acarretará um maior potencial invasivo e conseqüentemente, na progressão do câncer (Skrzydowska *et al*, 2005). No sentido de restabelecer o equilíbrio existente na célula normal, a utilização de cistatinas como agentes terapêuticos em novas estratégias anti-câncer tem sido sugerida (Keppler, 2006; Palermo e Joyce, 2007).

## 1.2 Cistatinas

As cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno proteases e seu mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva através do bloqueio da atividade proteolítica (Abrahamson, 1993). Vários modelos de interação entre as cistatinas e as cisteíno proteases alvos sugerem três regiões da cistatina envolvidas no reconhecimento: uma seqüência N-terminal contendo um resíduo de glicina, um motivo Gln-X-Val-X-Gly altamente conservado na região central formando um *loop*, e uma região contendo um resíduo de triptofano em um segundo *loop* próximo à extremidade C-terminal (Barrett, 1987). Esses três segmentos juntos formam uma estrutura em forma de cunha com boa complementaridade para a fenda do sítio ativo de cisteíno proteases do tipo papaína, com uma conformação que não permite a clivagem da cadeia polipeptídica da cistatina (**Figura 1.7**). Ambos os *loops*, das regiões central e C-terminal da cistatina, apresentam tamanhos e formas que se encaixam na região correspondente aos subsítios S1' e S2' da fenda do sítio ativo da enzima. O segmento N-terminal contendo o resíduo de glicina conservado nas cistatinas, se encaixa no subsítio S2 do sítio ativo da enzima, porém com uma conformação inapropriada para a proteólise enzimática (Bode *et al*, 1988; Turk e Bode, 1991; Abrahamson, 1993).



**Figura 1.7: Esquema da interação entre a cistatina C humana e uma cisteína protease do tipo papaína.** A fenda do sítio ativo da enzima, com os subsítios S e S', é mostrada na parte superior da figura, e a cadeia polipeptídica da cistatina é mostrada abaixo. Três segmentos da cistatina estão envolvidos na interação com a enzima: resíduos da região N-terminal (amarelo) interagem com alguns dos subsítios S da enzima; os dois *loops*, central (vermelho) e da região C-terminal (azul), formam juntos uma outra área de contato com os subsítios S' do sítio ativo da enzima. Fonte: Abrahamson, 1993.

As cistatinas são proteínas evolutivamente relacionadas estando agrupadas na “superfamília cistatina”. Membros desta superfamília são classificados em três famílias de cistatinas de origem animal (Barrett *et al*, 1986a), e uma família de cistatinas de plantas (Margis *et al*, 1998). A classificação em famílias é baseada nas similaridades da seqüência primária, massas moleculares, número de pontes dissulfeto e localização subcelular.

A família 1, ou família das estefinas, inclui as proteínas de cadeia simples que não formam pontes dissulfeto, com massas moleculares de aproximadamente 11 kDa, e que conservam um *loop* Gln-Val-Val-Ala-Gly na região central. Estas proteínas geralmente são citosólicas (Turk e Bode, 1991).

A família 2, ou família cistatina, compreende proteínas de cadeia simples que formam duas pontes dissulfeto intramoleculares próximas à região C-terminal. Estas

proteínas são glicosiladas, apresentam massas moleculares entre 13 e 24 kDa e conservam um *loop* central formado de Gln-X-Val-X-Gly. Estas cistatinas contêm uma seqüência sinal e são secretadas (Turk e Bode, 1991; Oliveira *et al*, 2003).

Na família 3, ou família cininogênio, estão os cininogênios do plasma sangüíneo, que são as cistatinas com massas moleculares mais altas (60 a 120 kDa). Estas proteínas apresentam repetições da seqüência Gln-Val-Val-Ala-Gly, formam pontes dissulfeto, são moléculas glicosiladas e também são secretadas (Turk e Bode, 1991).

A inclusão de uma quarta família, a das fitocistatinas, a qual contém os inibidores de cisteíno proteases de plantas, foi sugerida por Margis e colaboradores (Margis *et al*, 1998). Esta família apresenta características que são comuns às famílias 1 e 2, já que o tamanho e a seqüência primária das proteínas se assemelham aos da família cistatina, enquanto que se assemelham às estefinas na ausência de pontes dissulfeto e resíduos de cisteína. Além disso, possuem uma seqüência consenso L-A-R-[FY]-A-[VI]-X(3)-N, exclusiva de cistatinas de plantas, formando uma  $\alpha$ -hélice na região N-terminal, que justifica a sua inclusão em uma família própria (Margis *et al*, 1998).

As fitocistatinas estão envolvidas na regulação da atividade das proteases endógenas durante a maturação de sementes, e na defesa contra cisteíno proteases exógenas de insetos e nematóides, os quais geralmente têm essas proteases em seus intestinos (Arai *et al*, 2002). Estes inibidores têm sido identificados em uma variedade de plantas superiores, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. Alguns exemplos incluem 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), e morango (Martinez *et al*, 2005), entre outros.

A identificação de novas fitocistatinas é facilitada pela disponibilidade de bancos de ESTs originados em projetos de sequenciamento em grande escala. A partir do banco de dados do projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST – FAPESP), Reis e Margis (2001) identificaram 25 *clusters* consenso para fitocistatinas, os quais foram classificados em 4 grupos por meio de uma análise filogenética. O grupo I compreende as cistatinas com organização estrutural típica de fitocistatinas, ou seja, além das três regiões conservadas na superfamília cistatinas, apresentam uma seqüência consenso na região N-terminal característica de fitocistatinas. O grupo II inclui cistatinas com as mesmas características do grupo I, porém com uma extensão da região C-terminal. Os membros do grupo III apresentam as regiões conservadas na superfamília cistatina, mas não possuem a seqüência consenso característica das fitocistatinas. As cistatinas do grupo IV não apresentam nem o consenso N-terminal e nem o motivo QXVXG conservado entre os membros da superfamília (Reis e Margis, 2001).

A caracterização de cistatinas pertencentes a diferentes grupos, especialmente com ênfase na análise funcional, é fundamental para dar continuidade aos dados de seqüência gerados no projeto genoma. Em nosso laboratório foi caracterizada a primeira cistatina da cana-de-açúcar, a proteína Canacistatina. Este inibidor produzido de forma recombinante (Soares-Costa *et al*, 2002), mostrou-se eficiente na inibição de catepsinas humanas, assim como outras cisteíno proteases (Oliva *et al*, 2004). Desde que cistatinas pertencentes a diferentes grupos são caracterizadas por diferenças estruturais, espera-se que as diferentes cistatinas apresentem perfis específicos de atividade inibitória contra cisteíno proteases, como por exemplo, as catepsinas. Em particular, a caracterização de

cistatinas que inibam eficientemente as catepsinas B e L é de grande importância, considerando o envolvimento destas nos processos de invasão tumoral e metástase.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho visa a caracterização de novas cistatinas da cana-de-açúcar e a avaliação da atividade inibitória destas sobre o processo de invasão da linhagem celular de câncer mamário humano MDA-MB-231. Neste sentido, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Análises *in silico* de três cistatinas da cana-de-açúcar
- Isolamento das ORFs das cistatinas e subclonagem em vetor de expressão
- Expressão heteróloga em *Escherichia coli* e purificação das proteínas
- Produção de anticorpos policlonais contra as cistatinas recombinantes
- Avaliação da estabilidade térmica das cistatinas recombinantes
- Ensaio de atividade inibitória das cistatinas recombinantes contra as catepsinas B e L humanas
- Construção de formas mutantes das cistatinas e análise da atividade inibitória
- Ensaio de inibição da proliferação, adesão, migração e invasão da linhagem celular MDA-MB-231 utilizando as cistatinas recombinantes
- Ensaio de proliferação, adesão, migração e invasão de células MDA-MB-231 transfectadas com os genes das cistatinas da cana-de-açúcar

No sentido de facilitar a compreensão do trabalho, este foi dividido em dois capítulos, os quais descrevem a caracterização das cistatinas da cana-de-açúcar e o estudo do efeito das cistatinas no processo de invasão das células MDA-MB-231.

## **CAPÍTULO 1**

**Caracterização das cistatinas da cana-de-açúcar**

**CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4**

### **3 CAPÍTULO 1**

Este capítulo descreve a identificação de três cistatinas da cana-de-açúcar a partir dos dados gerados pelo projeto genoma SUCEST-FAPESP, a obtenção destas proteínas de forma recombinante, e a análise da atividade inibitória das cistatinas frente às catepsinas B e L humanas através de ensaios fluorimétricos.

### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1.1 Análises *in silico* das seqüências das cistatinas

As cistatinas foram identificadas a partir do banco de dados de seqüências de ESTs gerado no projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST - FAPESP), utilizando os programas BLASTX e tBLASTX (Altschul *et al*, 1997), e tendo como referência a seqüência da Canacistatina (Soares-Costa *et al*, 2002). O critério utilizado para a seleção das cistatinas foi a presença das regiões características da superfamília: um resíduo de glicina conservado na região N-terminal, o motivo Gln-X-Val-X-Gly, e um resíduo de triptofano conservado na região C-terminal. O seqüenciamento dos clones de cDNA foi realizado em nosso laboratório para obtenção dos clones completos, uma vez que nem todas as cistatinas possuíam a seqüência completa depositada no banco de dados. A massa molecular teórica, o índice de instabilidade e o coeficiente de extinção molar das proteínas foram calculados usando o programa ProtParam. Os gráficos de hidrofobicidade foram gerados com o programa ProtScale de acordo com a escala de hidrofobicidade de Kyte e Doolittle (1982) e utilizando uma “janela” de 9 aminoácidos. A presença de um possível peptídeo sinal e a predição da localização subcelular foram determinadas utilizando os programas SignalP (Nielsen e Krogh, 1998) e PSORT (Nakai e Horton, 1999). A predição da estrutura secundária das cistatinas foi realizada com o programa PSIPRED (McGuffin *et al*, 2000). Os programas acima citados estão disponíveis no *site* <http://www.expasy.org>. Finalmente, os alinhamentos de seqüências foram realizados com o programa Multalin (Corpet, 1988) disponível em <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/>.

### 3.1.2 Isolamento de ORFs que codificam as novas cistatinas da cana-de-açúcar

As ORFs correspondentes às cistatinas por nós denominadas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 foram amplificadas por PCR a partir dos clones de cDNA SCSBHR1053A07, SCSFHR1043A02 e SCMCRT2087B02, respectivamente, utilizando *primers* específicos (**Tabela 3.1**). Nestes foram inseridos sítios para as enzimas de restrição *Nde* I e *Eco* RI, para posterior subclonagem direcional no vetor de expressão.

<b>CaneCPI-2 Forward</b>	5' <u>CCCATATG</u> TCGTCCACCCGCAA 3'
<b>CaneCPI-2 Reverse</b>	5' CCGA <u>ATTCTT</u> AGGCGCTAGCACC 3'
<b>CaneCPI-3 Forward</b>	5' <u>CCCATATG</u> GCCGGCCACGTCCT 3'
<b>CaneCPI-3 Reverse</b>	5' CCGA <u>ATTCTT</u> ATGTAACACAAAC 3'
<b>CaneCPI-4 Forward</b>	5' <u>CCCATATG</u> GCGCGTGCGGGGGC 3'
<b>CaneCPI-4 Reverse</b>	5' CCGA <u>ATTCTC</u> AGTCGGCCGACG 3'

**Tabela 3.1: Sequências dos *primers* utilizados no isolamento das ORFs CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.** Os sítios para as enzimas de restrição *Nde* I (CATATG) e *Eco* RI (GAATTC) estão sublinhados.

Para a obtenção do DNA molde (plasmídeo pSPORT1 contendo os cDNAs completos com as respectivas ORFs), os três clones bacterianos foram crescidos em meio LB (USB) contendo o antibiótico ampicilina na concentração final de 100 µg/mL, e o DNA plasmidial foi purificado através do método de lise alcalina como descrito em Sambrook e Russel, 1989. Em cada PCR de volume final de 100 µL foram utilizados 10 ng do molde, 200 µM de cada dNTP (Promega), tampão de reação 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM), 20 pmoles de cada *primer* e 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). O protocolo de

amplificação utilizado em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) iniciou-se com uma temperatura de 94°C por 3 min para desnaturação do DNA, seguida por 35 ciclos de amplificação de 45 s a 94°C (desnaturação), 30 s a 55°C (*annealing*) e 1 min a 72°C (extensão). O protocolo finalizou-se com uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos das três amplifica es foram analisados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (1 µg/mL) e visualizados em luz UV.

### 3.1.3 Constru o dos plasmídeos de expressão

Os fragmentos correspondentes às três cistatinas foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega), e subclonados no vetor de propaga o pTZ57R (Fermentas) (**Figura 3.1**). Já que a *Taq* DNA polimerase adiciona um nucleotídeo de adenina (A) na extremidade 3' dos fragmentos amplificados, a liga o destes ao vetor pTZ57R   facilitada pela presença de um nucleotídeo de timina (T) em ambas as extremidades 3' do plasmídeo.

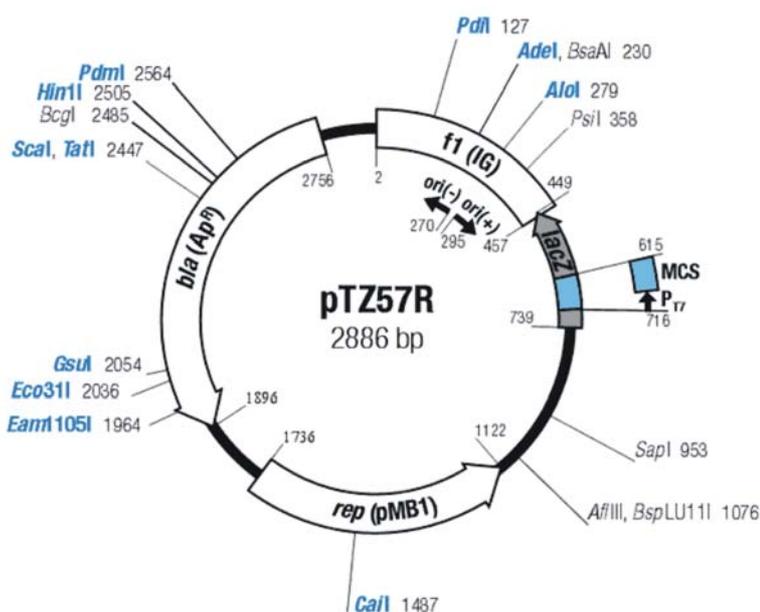


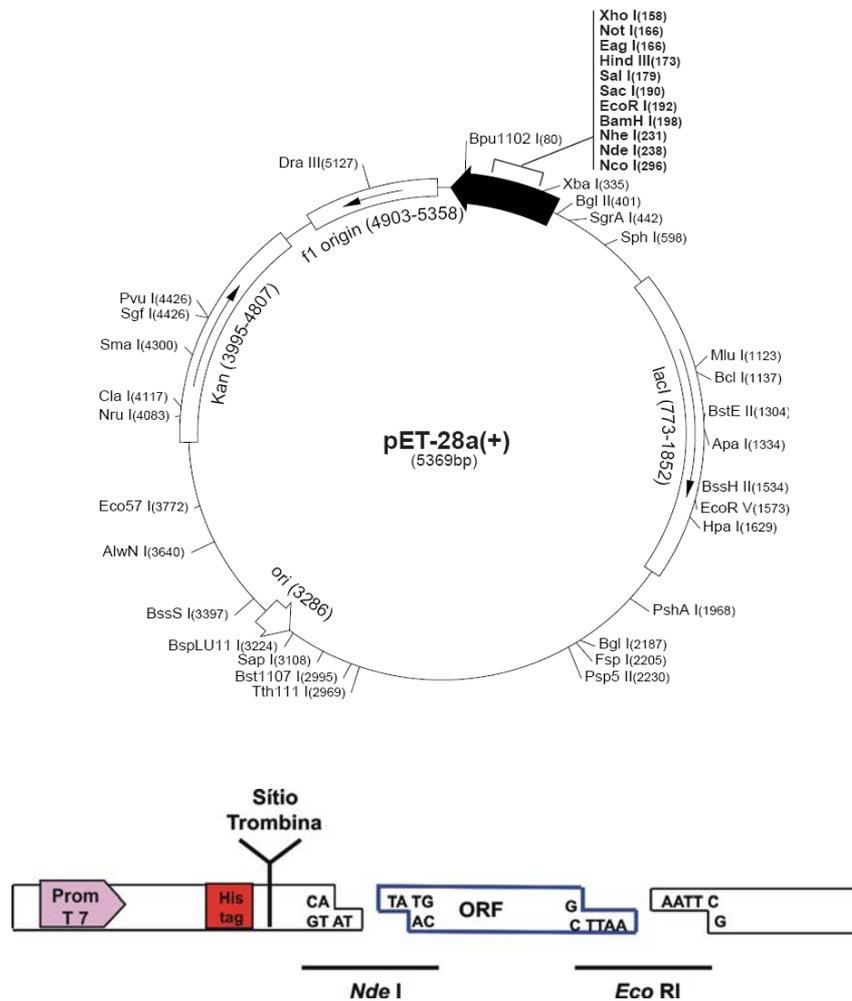
Figura 3.1: Plasmídeo pTZ57R utilizado como vetor de propaga o.

As reações de ligação foram feitas em um volume final de 10  $\mu$ L e continham 55 ng do vetor, 50 ng do fragmento, 1 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão da enzima 1x [Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1 mM, DTT (dithiothreitol) 1 mM, polietilenoglicol (PEG) 8000 5% (w/v)]. Estas foram mantidas a 4°C por 16 h e utilizadas para transformar, pelo método de choque térmico, células competentes da cepa de propagação *E. coli* DH5 $\alpha$  (SupE44  $\Delta$ lac U169  $\phi$ 80 lacZ  $\Delta$ M15 *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) preparadas por tratamento com cloreto de cálcio (Sambrook e Russel, 1989).

Os clones bacterianos contendo os vetores recombinantes (pTZ57R + ORF) foram selecionados em meio LB ágar (USB) contendo 100  $\mu$ g/mL do antibiótico ampicilina, 500 mM de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo) e 40  $\mu$ g/mL de X-Gal (5Bromo-4Cloro-3Indolyl-BDGalactoside), substrato da enzima  $\beta$ -galactosidase. O sítio para a clonagem do fragmento de PCR está dentro da região que codifica o peptídeo  $\alpha$  da enzima  $\beta$ -galactosidase, permitindo a identificação dos clones recombinantes por um *screening* de coloração da colônia bacteriana. Se o fragmento não estiver inserido no vetor, a enzima  $\beta$ -galactosidase degrada o substrato X-Gal adicionado ao meio, conferindo uma coloração azul à colônia. A inserção do fragmento inativa o peptídeo  $\alpha$ , e conseqüentemente a enzima  $\beta$ -galactosidase. Desta forma, não haverá a degradação do substrato e a colônia permanecerá com sua cor natural (branca).

Uma vez selecionados os clones recombinantes, os plasmídeos foram purificados através do método de lise alcalina. Estes foram posteriormente clivados com as enzimas de restrição *Nde* I e *Eco* RI para recuperação dos fragmentos correspondentes às cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 contendo extremidades coesivas, as quais permitiram a posterior subclonagem direcional no

vetor de expressão pET28a (**Figura 3.2**) previamente clivado com as mesmas enzimas.



**Figura 3.2:** Esquema da construção dos plasmídeos pET28a contendo os genes das cistatinas.

Nas reações de clivagem para obtenção dos fragmentos e do vetor pET28a com extremidades coesivas, foram utilizados 2 µg do DNA plasmidial, 2 U de cada uma das enzimas *Nde* I e *Eco* RI (Fermentas) e tampão Tango® 2x [Tris-acetato 66 mM (pH 7,9 a 37°C), acetato de magnésio 20 mM, acetato de potássio 132 mM, BSA 0,2 mg/mL], em um volume final de 40 µL. As reações de clivagem foram mantidas a 37°C por 2 h e, posteriormente, analisadas por meio de eletroforese em gel de

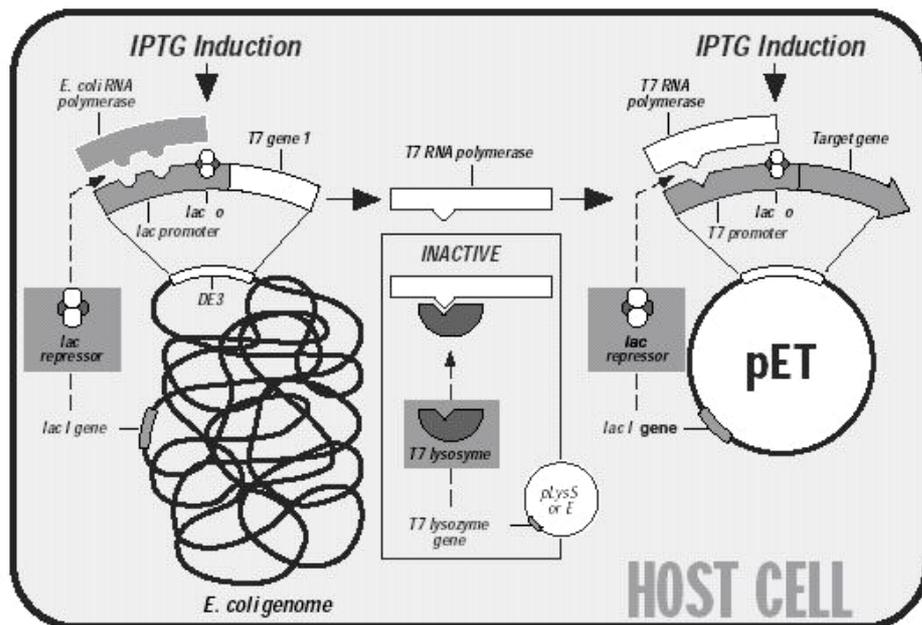
agarose 1%. Os fragmentos correspondentes às cistatinas e o vetor pET28a clivados foram recuperados do gel de agarose, purificados com kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) e utilizados nas reações de ligação. Estas continham em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , 100 ng do vetor, 50 ng do fragmento, 1 U da enzima T4 DNA ligase e tampão da enzima 1x. As reações de ligação foram incubadas a 4°C por 16 h e mais tarde utilizadas para transformar, por choque térmico, células de *E. coli* DH5- $\alpha$  competentes.

Aquelas bactérias que receberam o plasmídeo foram selecionadas em meio LB ágar contendo 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do antibiótico canamicina. A técnica de “PCR de colônia” foi usada para confirmar que o plasmídeo recebido continha o gene inserido. Dez colônias foram escolhidas e repicadas com palitos de dente estéreis em dez tubos de 1,5 mL contendo 30  $\mu\text{L}$  de água Mili Q autoclavada. Os tubos foram então mantidos por 5 min em água fervente para uma lise rápida das células e liberação do DNA plasmidial. Do material resultante desta lise, 2  $\mu\text{L}$  foram adicionados como molde em 10 PCRs de 20  $\mu\text{L}$  finais, nas quais foram utilizados os respectivos *primers* específicos. O protocolo de PCR e o programa de amplificação foram os mesmos que os utilizados para a obtenção dos fragmentos (item 3.1.2). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1%. Para confirmação dos resultados obtidos por PCR de colônia, os plasmídeos recombinantes foram purificados através do método de lise alcalina e sequenciados.

#### **3.1.4 Expressão das cistatinas recombinantes**

O sistema pET (Novagen) foi desenvolvido para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Os genes de interesse são clonados nos plasmídeos pET sob controle transcricional do promotor do bacteriófago T7. Como a cepa hospedeira

da expressão contém no seu cromossomo uma cópia do gene da RNA polimerase T7 sob controle do promotor *lacUV5*, a expressão pode ser induzida pela adição de IPTG ou lactose na cultura bacteriana. Desta forma, o IPTG induz a expressão da RNA polimerase T7, a qual uma vez sintetizada, liga-se ao promotor T7 e ativa a expressão do gene clonado no vetor pET (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3: Sistema pET de expressão de proteínas.** A expressão do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7, presente no genoma da bactéria, é induzida após a adição de IPTG. Uma vez sintetizada, a enzima reconhece o promotor T7 presente no plasmídeo pET e transcreve o gene de interesse. Fonte: Manual do Sistema pET (Novagen).

O vetor pET28a permite a subclonagem direcional do gene de interesse em fase com uma seqüência que codifica uma “cauda” de seis histidinas na extremidade C ou N-terminal. Esta “His-Tag” facilita a purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade e posteriormente pode ser removida, já que entre a seqüência da proteína de interesse e as histidinas existe um sítio para a protease trombina.

A cepa bacteriana utilizada para a expressão heteróloga das proteínas da

cana-de-açúcar foi a *E. coli* Rosetta (DE3). Esta possui o fragmento DE3 que codifica a RNA polimerase do bacteriófago T7, a qual permite a transcrição do gene subclonado no vetor pET28a sob controle do promotor T7. Além disso, possui uma mutação no gene da enzima lactose permease (*lacY1*) permitindo a entrada uniforme de IPTG na célula, ajustando assim o nível de expressão protéica. Por último, a cepa contém genes para tRNAs codificados em plasmídeo resistente a cloranfenicol, específicos para os códons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC e GGA, os quais são raramente utilizados pela *E. coli*, permitindo assim, a expressão neste hospedeiro de genes heterólogos que possuam tais códons.

Os plasmídeos de expressão recombinantes foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3). Uma única colônia foi repicada em um pré-inóculo de 10 mL de meio LB líquido contendo 25 µg/mL dos antibióticos canamicina e cloranfenicol, o qual foi mantido sob agitação de 200 rpm a 37°C por 16 h. No dia seguinte, foi realizada uma diluição 1:100 em 500 mL de meio LB líquido contendo 25 µg/mL de canamicina e cloranfenicol, e a cultura foi mantida sob agitação constante de 200 rpm a 37°C até que atingisse a fase logarítmica de crescimento bacteriano (densidade óptica de aproximadamente 0,5 a um comprimento de onda de 600 nm). A expressão foi então induzida pela adição de IPTG a uma concentração final de 0,2 mM. Alíquotas foram coletadas da cultura em intervalos de uma hora após a indução para posterior análise da expressão das proteínas em SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970). Após 4 h de indução, as células foram coletadas por centrifugação a 6.000 rpm, a 4°C por 5 min em centrífuga Sorvall RC5C plus. O precipitado contendo as bactérias foi ressuspendido em tampão de lise pH 8 (NaCl 300 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, Tris 10 mM) e submetido à lise celular por meio de sonicação com 5 pulsos de 1 min à potência de 20%, com

intervalos de 30 s, utilizando-se o sonicador Sonic Dismembrator 500 (Fisher Scientific). O lisado foi então centrifugado a 13.000 rpm, a 4°C por 15 min para separação das frações solúvel e insolúvel, das quais foram coletadas amostras para análise em SDS-PAGE.

### **3.1.5 Purificação das cistatinas recombinantes**

As cistatinas foram purificadas da fração solúvel por cromatografia de afinidade utilizando colunas contendo 5 mL de resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), conforme descrito por Soares-Costa e colaboradores (2002). Como as proteínas foram expressas em fusão com uma “cauda” de histidinas (His-Tag) derivada do vetor pET28a e considerando que resíduos de histidina têm afinidade pelo níquel, estas puderam ser purificadas em etapa única neste procedimento. Para isso, as frações solúveis contendo as cistatinas recombinantes foram passadas pelas respectivas colunas previamente equilibradas com 5 volumes (25 mL) de tampão de lise. A resina foi então lavada com 3 volumes (15 mL) de tampão de lise e 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, que também apresenta forte afinidade pelo níquel, compete com as histidinas pela ligação ao metal, liberando a proteína de fusão. As frações eluídas foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 15%.

As frações contendo as proteínas puras foram dialisadas em membranas (Pierce) de 3500 MW (CaneCPI-2 e CaneCPI-4) ou 14000 MW (CaneCPI-3) contra 1 L de tampão PBS a 4°C (três trocas). Em seguida, as proteínas foram esterilizadas em filtro Millex® GV de 0,22 µm / 25 mm (Millipore). As concentrações das cistatinas foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando o reagente

*Bio Rad Protein Assay* (Bio-Rad) e a albumina sérica bovina como padrão. Quando necessário, as proteínas foram concentradas utilizando-se colunas centriprep YM-3, para as cistatinas CaneCPI-2 e CaneCPI-4, e centriprep YM-10, para a cistatina CaneCPI-3 (Amicon Bioseparations-Millipore). Para tanto, 10 mL das soluções contendo as proteínas foram adicionados aos filtros, os quais foram centrifugados em uma centrífuga Eppendorf 5810 R a 4.000 rpm, 4°C.

### **3.1.6 Produção de anticorpos policlonais contra as cistatinas recombinantes e ensaio de *Western blot***

Anticorpos policlonais anti-CaneCPI-2, anti-CaneCPI-3 e anti-CaneCPI-4 contra as proteínas recombinantes foram gerados em camundongos, usando um protocolo padrão de imunização (Sambrook e Russel, 1989). Uma mistura de 50 µg de CaneCPI-2, CaneCPI-3 ou CaneCPI-4 com igual volume de adjuvante completo de Freund (Sigma) foi injetada subcutaneamente em cinco camundongos de dois meses de idade (5 camundongos para cada cistatina). Depois de 45 dias, outra injeção foi aplicada, desta vez com as proteínas misturadas em igual volume de adjuvante incompleto de Freund (Sigma). O adjuvante completo é composto por uma emulsão de óleo e água, a qual localiza o antígeno por um período de tempo maior, e por um extrato de bactérias do gênero *Mycobacterium*, o qual atrai macrófagos para o sítio de injeção. O adjuvante incompleto não contém o componente bacteriano, sendo composto apenas pela emulsão de óleo e água. Duas semanas depois da última aplicação, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado. Este foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 min para separação do soro, o qual foi utilizado em ensaios de *Western blot*.

As amostras a serem analisadas por *Western blot* foram separadas em SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Invitrogen) em tampão de transferência (Tris 200 mM, Glicina 50 mM, metanol 20%) durante 2 h a 150 V e 150 mA. Após a transferência, as membranas foram coradas por 5 min em solução de Ponceau (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%) para visualização das bandas. As membranas foram então bloqueadas com uma solução de leite em pó desnatado (Molico) 5% diluído em TBS 1x (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM) a 4°C por 16 h. Mais tarde, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS (5 min cada) sob agitação, e incubadas por 2 h com o respectivo anticorpo primário (soro proveniente dos camundongos imunizados) diluído 1:10.000 em TBS, sob agitação suave à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (Anti-Mouse IgG conjugado à fosfatase alcalina – Sigma) diluído 1:10.000 por 2 h sob agitação suave à temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram lavadas e as bandas de proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas com o kit *AP Conjugate Substrate* (BioRad).

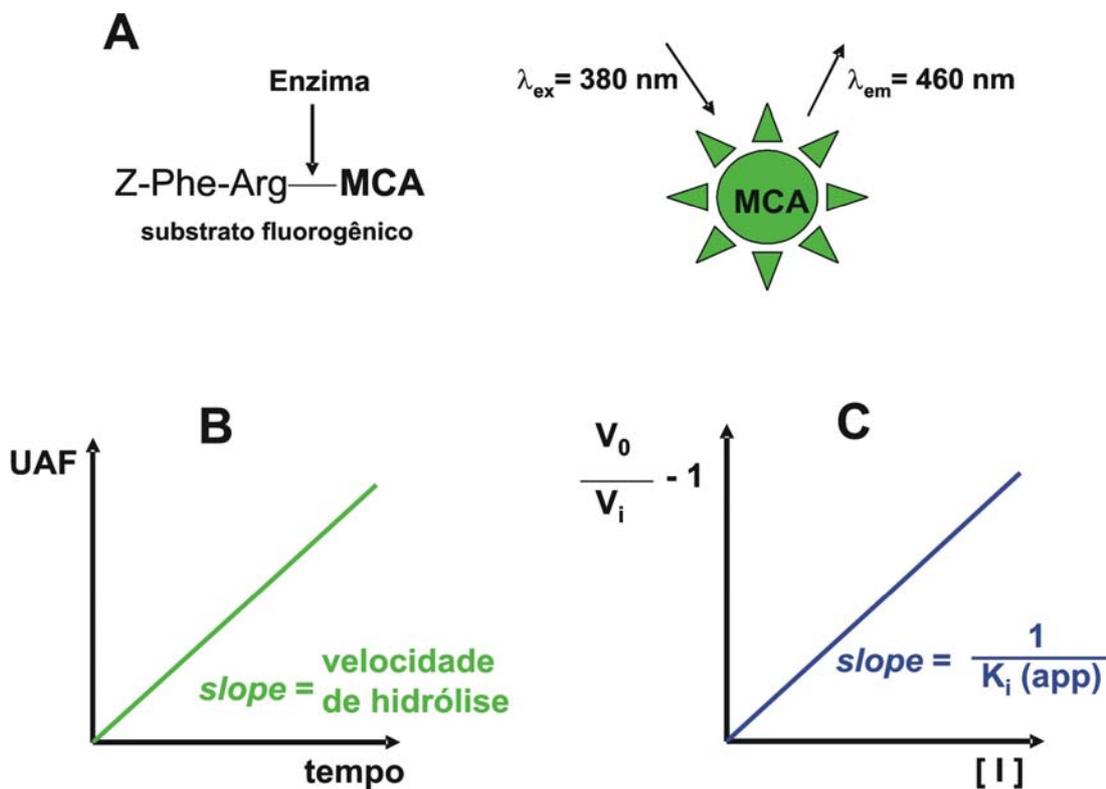
Para a detecção das cistatinas endógenas da cana-de-açúcar, diferentes tecidos da planta foram homogeneizados em nitrogênio líquido, e as proteínas foram extraídas com o reagente TriZol (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de proteínas foram finalmente solubilizadas em tampão de amostra para SDS-PAGE 1x (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol 10%, dodecil sulfato de sódio 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,1%) e utilizadas em ensaios de *Western blot* como descrito acima.

### 3.1.7 Ensaio de inibição das catepsinas B e L humanas

A atividade inibitória das novas cistatinas da cana-de-açúcar foi testada contra as catepsinas B e L humanas (Calbiochem) em um espectrofluorímetro Hitachi F-2000. Estes testes foram realizados no laboratório da professora Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona, do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

Os ensaios foram realizados em cubeta de quartzo de 1 mL, a 37°C e em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5. Para os ensaios de inibição, as catepsinas B (0,5 nM) e L (1 nM) foram pré-ativadas com 2,5 mM de DTT (dithiothreitol) por 5 min. O DTT é utilizado como agente redutor do resíduo de cisteína presente no sítio ativo das cisteíno proteases. A cistatina foi então adicionada e uma pré-incubação de 5 min seguiu-se para a interação da enzima com o inibidor. Como controle negativo foi adicionada a fração eluída com 250 mM de imidazol obtida da purificação das proteínas de uma cultura induzida de *E. coli* Rosetta (DE3) hospedeira contendo o vetor pET28a. O substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA (carbобензохисarbonil-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina) (Calbiochem) foi adicionado na cubeta na concentração de 0,01 mM e as mudanças na fluorescência foram continuamente monitoradas.

A hidrólise resulta na liberação da molécula de MCA, a qual, ao ser excitada no comprimento de onda de 380 nm, emite uma fluorescência no comprimento de onda de 460 nm que é detectada pelo fluorímetro (**Figura 3.4A**). Desta forma, o aumento na fluorescência é proporcional à velocidade de reação (**Figura 3.4B**). Os valores das velocidades de hidrólise obtidas na ausência do inibidor ( $V_0$ ) e na presença do inibidor em diferentes concentrações ( $V_i$ ) são utilizados para gerar um gráfico, cuja inclinação (*slope*) determina o valor da constante de inibição aparente ( $K_i$  app), conforme mostrado na **figura 3.4C**.

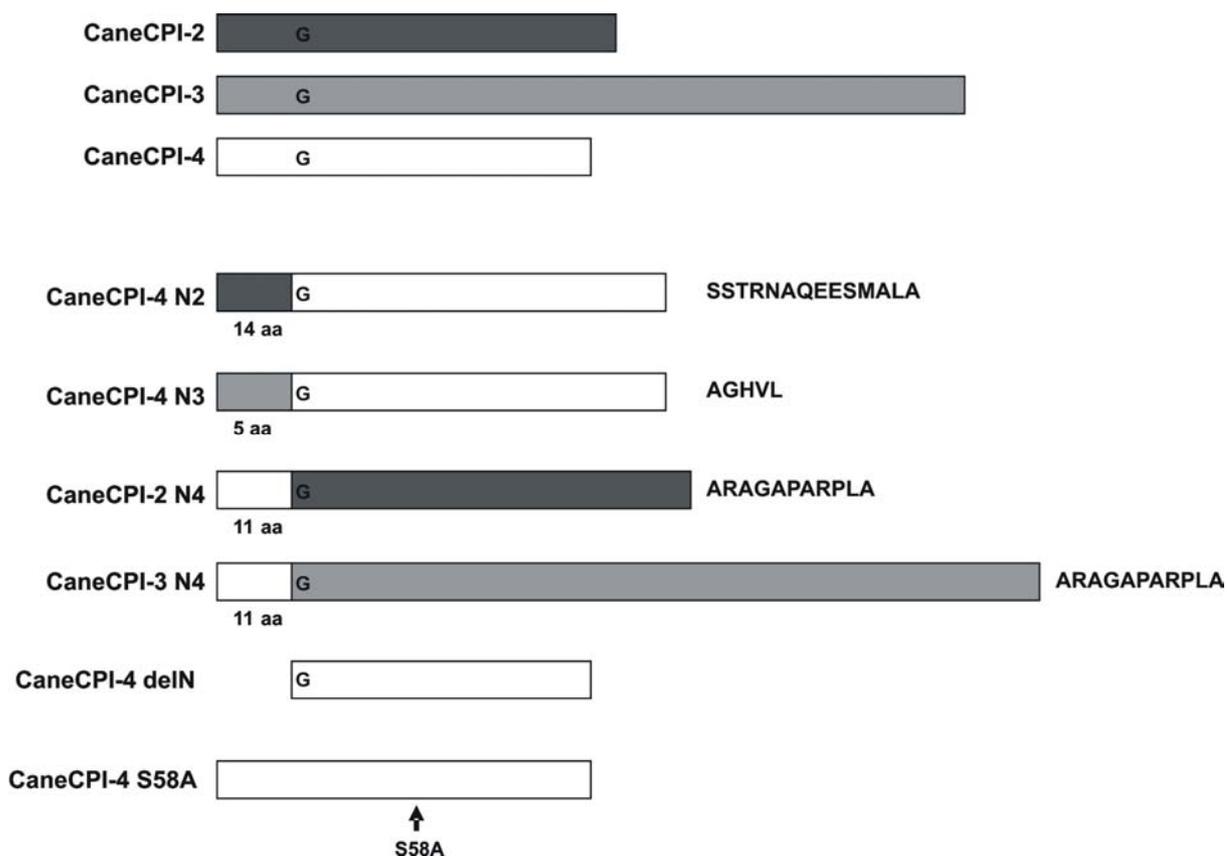


**Figura 3.4: Determinação da atividade enzimática e da constante de inibição  $K_i \text{ app}$  utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA.** Ver explicação de A, B e C no texto. UAF: unidades arbitrárias de fluorescência. [I]: concentração do inibidor.

Os valores de  $K_i \text{ app}$  dos complexos enzima-inibidor foram calculadas segundo o procedimento de Morrison (Knight, 1986) usando o programa GraFit (Leatherbarrow, 1992).

### 3.1.8 Construção de formas mutantes das cistatinas e análise da atividade inibitória

Para o melhor entendimento da atividade inibitória apresentada pelas cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4, foram construídas seis cistatinas mutantes (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5: Cistatinas mutantes construídas a partir das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.** Na construção dos mutantes, os aminoácidos da região N-terminal localizados antes da glicina conservada (G) da CaneCPI-4 foram deletados (**CaneCPI-4 delN**), ou substituídos pela mesma região da CaneCPI-2 (**CaneCPI-4 N2**) ou CaneCPI-3 (**CaneCPI-4 N3**). As cistatinas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 também tiveram os aminoácidos da região N-terminal antes da glicina conservada substituídos pelos aminoácidos da mesma região da CaneCPI-4 (**CaneCPI-2 N4** e **CaneCPI-3 N4**). Por último, uma forma mutante da CaneCPI-4 (**CaneCPI-4 S58A**) continha uma substituição serina → alanina dentro do motivo conservado QXVXG. As seqüências de aminoácidos correspondem à nova região N-terminal da forma mutante.

Para a obtenção das ORFs correspondentes aos mutantes CaneCPI-4 N2, CaneCPI-4 N3, CaneCPI-2 N4 e CaneCPI-3 N4 foram realizadas duas ampliações

por PCR consecutivas. Na primeira, as ORFs foram amplificadas utilizando-se os moldes e os *primers* descritos na **tabela 3.2**, e os seguintes ciclos de amplificação: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 65°C e 1 min a 72°C, e uma extensão final de 10 min a 72°C.

<b>Mutante</b>	<b>Molde</b>	<b>Primers</b>
<b>CaneCPI-4 N2</b>	pET28aCaneCPI-4	<b>4_N2:</b> 5' TCGTCCACCCGCAACGCACAAGAGGAGTCTATGGCG CTCGCCGGCGGGTGGTTCCCG 3' <b>CaneCPI-4 Reverse:</b> 5' CCGAATTCTCAGTCGGCCGACG 3'
<b>CaneCPI-4 N3</b>	pET28aCaneCPI-4	<b>4_N3:</b> 5' GCCGGCCACGTCTCTCGGCGGGTGGTTCCCGATCAGG3' <b>CaneCPI-4 Reverse:</b> 5' CCGAATTCTCAGTCGGCCGACG 3'
<b>CaneCPI-2 N4</b>	pET28aCaneCPI-2	<b>2_N4:</b> 5' GCGCGTGCGGGGGCCCCTGCACGGCCGTTGGCCGG CGGCATCAAGGACG 3' <b>CaneCPI-2 Reverse:</b> 5' CCGAATTCTTAGGCGCTAGCACC 3'
<b>CaneCPI-3 N4</b>	pET28aCaneCPI-3	<b>3_N4:</b> 5' GCGCGTGCGGGGGCCCCTGCACGGCCGCTCGCCGG CGGCGTGAAGGACAACCC 3' <b>CaneCPI-3 Reverse:</b> 5' CCGAATTCTTATGTAACACAAAAC 3'

**Tabela 3.2:** Molde e *primers* utilizados na primeira amplificação para a obtenção das ORFs correspondentes aos mutantes CaneCPI-4 N2, CaneCPI-4 N3, CaneCPI-2 N4 e CaneCPI-3 N4.

Os produtos das amplificações foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) e utilizados como moldes na segunda amplificação. Nesta foram utilizados os *primers* descritos na **tabela 3.3** e os seguintes ciclos de amplificação: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 30 s a 55°C e 1 min a 72°C, e uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos da segunda amplificação foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) e subclonados no vetor de expressão pET28a conforme descrito no item 3.1.3.

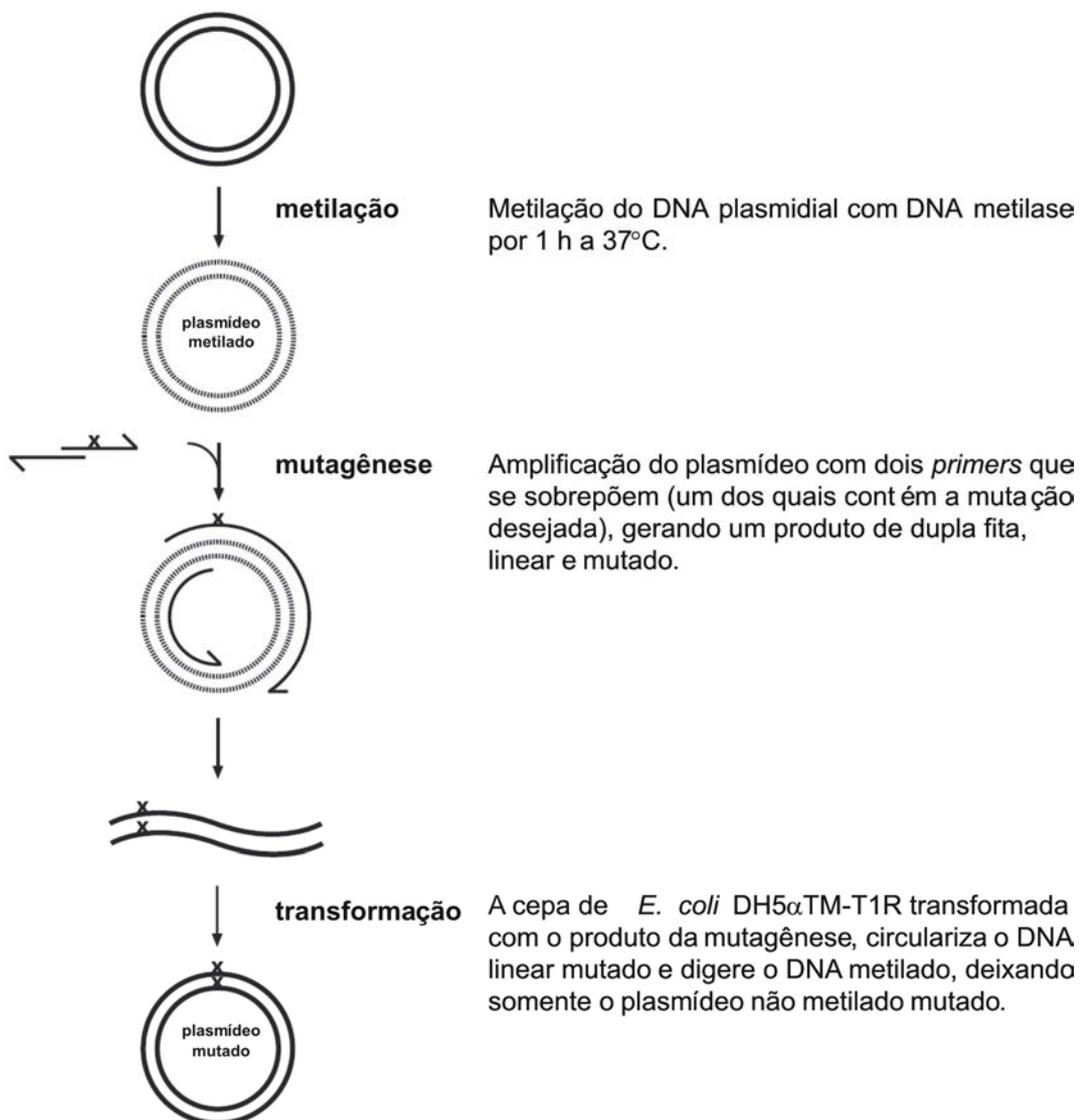
<b>Mutante</b>	<b>Primers</b>
<b>CaneCPI-4 N2</b>	CaneCPI-2 Forward: 5' CCCATATGTCGTCCACCCGCAA 3' CaneCPI-4 Reverse: 5' CCGAATTCTCAGTCGGCCGACG 3'
<b>CaneCPI-4 N3</b>	CaneCPI-3 Forward: 5' CCCATATGGCCGGCCACGTCCT 3' CaneCPI-4 Reverse: 5' CCGAATTCTCAGTCGGCCGACG 3'
<b>CaneCPI-2 N4</b>	CaneCPI-4 Forward: 5' CCCATATGGCGCGTGCGGGGGC 3' CaneCPI-2 Reverse: 5' CCGAATTCTTAGGCGCTAGCACC 3'
<b>CaneCPI-3 N4</b>	CaneCPI-4 Forward: 5' CCCATATGGCGCGTGCGGGGGC 3' CaneCPI-3 Reverse: 5' CCGAATTCTTATGTAACACAAAC 3'

**Tabela 3.3:** *Primers* utilizados na segunda amplificação para a obtenção das ORFs correspondentes aos mutantes CaneCPI-4 N2, CaneCPI-4 N3, CaneCPI-2 N4 e CaneCPI-3 N4.

Para a obtenção da ORF correspondente ao mutante CaneCPI-4 delN, foi realizada uma única amplificação por PCR, utilizando o plasmídeo pET28aCaneCPI-4 como molde e os primers CaneCPI-4delN: 5' CATATGGGCGGGTGGTTCCCG 3' e CaneCPI-4 Reverse: 5' CCGAATTCTCAGTCGGCCGACG 3'. Os ciclos de amplificação utilizados foram: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 30 s a 55°C e 1 min a 72°C, e uma extensão final de 10 min a 72°C. O produto da amplificação foi purificado com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) e subclonado no vetor de expressão pET28a conforme descrito no item 3.1.3. Os plasmídeos contendo as ORFs CaneCPI-4 N2, CaneCPI-4 N3, CaneCPI-2 N4, CaneCPI-3 N4 ou CaneCPI-4 delN foram utilizados para transformar a cepa de *E. coli* Rosetta (DE3), a qual foi utilizada para expressão e posterior purificação das cistatinas mutantes, conforme descrito nos itens 3.1.4 e 3.1.5, respectivamente.

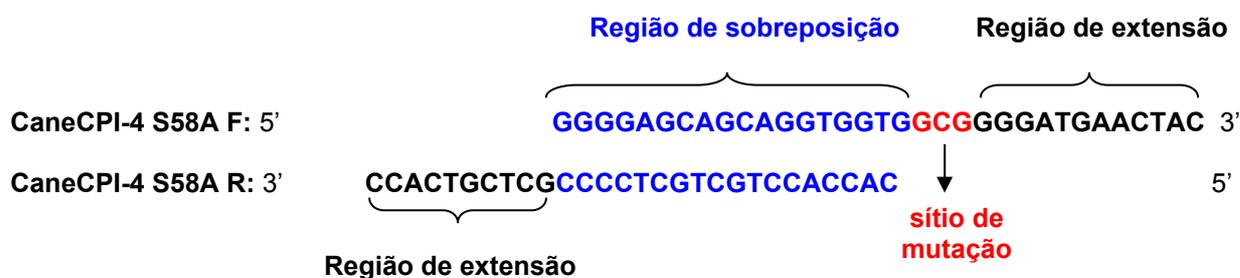
A cistatina mutante CaneCPI-4 S58A foi obtida através da técnica de mutação sítio-dirigida utilizando o kit *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen). Este sistema baseia-se nas propriedades das enzimas DNA metilase e *McrBC* endonuclease, como mostrado na **figura 3.6**. O método consiste de uma

reação de metilação e uma reação de mutagênese (PCR), na qual o plasmídeo metilado serve de molde para a amplificação a partir de *primers* que se sobrepõem, sendo que um deles contém a mutação desejada. O produto da amplificação é então transformado na cepa bacteriana *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1<sup>R</sup>, a qual circulariza o DNA linear mutado e, através da atividade da *McrBC* endonuclease, digere o DNA metilado que serviu como molde na amplificação que gerou o DNA mutado.



**Figura 3.6: Metodologia da mutagênese sítio-dirigida.** Etapas da geração de mutações sítio-dirigidas segundo o protocolo do kit *GeneTailor<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen).

Primeiramente, 100 ng do plasmídeo pET28aCaneCPI-4 foram metilados em uma reação contendo 4 U da DNA metilase, tampão da enzima 1x e SAM (S-adenosil-metionina) 16 mM, a qual foi mantida por 1 h a 37°C. Este DNA plasmidial metilado (30 ng) foi utilizado como molde em uma PCR (reação de mutagênese) contendo 2,5 U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), tampão da reação 1x [Tris-SO<sub>4</sub> 60 mM pH 8,9, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 mM], 200 μM de cada dNTP (Promega) e 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, além de 10 pmoles de cada um dos seguintes *primers*:



O protocolo de amplificação continha os seguintes ciclos: 94°C por 2 min, 25 ciclos de 30 s a 94°C e 3 min a 68°C, e uma extensão final de 10 min a 68°C. Posteriormente, 10 μL da PCR foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5α<sup>TM</sup>-T1<sup>R</sup>. Para a confirmação da mutação, o DNA plasmidial dos clones bacterianos selecionados em meio ágar contendo o antibiótico canamicina (25 μg/mL), foi extraído por lise alcalina e seqüenciado. Por último, o plasmídeo que continha a ORF da cistatina CaneCPI-4 mutada foi utilizado para transformar a cepa de *E. coli* Rosetta (DE3), a qual foi utilizada para expressão e posterior purificação da cistatina mutante, conforme descrito nos itens 3.1.4 e 3.1.5, respectivamente.

A atividade inibitória das cistatinas mutantes foi testada contra as catepsinas B e L humanas conforme descrito no item 3.1.7. A atividade residual da enzima foi calculada a partir dos *slopes* das retas gerados com o programa FL Solutions 2.0, e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ausência da cistatina). Cada medida foi realizada em triplicata.

### **3.1.9 Análise da estabilidade das cistatinas recombinantes**

As cistatinas recombinantes foram estudadas quanto a sua resistência a altas temperaturas. Estas foram submetidas à fervura por 5, 15 e 30 min e posteriormente deixadas sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente (diminuição gradual da temperatura). A seguir, a atividade inibitória das cistatinas contra a papaína foi medida em um espectrofluorímetro como descrito no item 3.1.7. A atividade residual da enzima foi calculada a partir dos *slopes* das retas geradas com o programa FL Solutions 2.0, e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle. Cada medida foi realizada em triplicata.

A estabilidade das cistatinas também foi avaliada quanto à temperatura e condições de armazenamento. Alíquotas das cistatinas puras foram armazenadas em diferentes temperaturas, 4, -20 e -80°C, sob duas condições, com ou sem a adição de 10% de glicerol. A atividade inibitória destas alíquotas contra a papaína foi testada como descrito no item 3.1.7, de 10 em 10 dias durante 3 meses. A atividade residual da enzima foi calculada a partir dos *slopes* das retas gerados com o programa FL Solutions 2.0. A atividade inibitória, expressa como porcentagem, foi obtida da diferença entre a atividade residual da papaína na ausência das cistatinas (considerada 100%) e a atividade residual da enzima na presença das cistatinas submetidas ou não ao tratamento. Cada medida foi realizada em triplicata.

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 Análises *in silico* das seqüências das cistatinas

Vários clones de cDNAs que codificam possíveis cistatinas foram identificados através da busca realizada no banco de ESTs gerado no projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST - FAPESP), utilizando o programa BLAST. A princípio, quatro destas cistatinas seriam selecionadas para estudo, sendo cada uma delas pertencente a cada um dos quatro grupos nos quais as cistatinas da cana-de-açúcar foram classificadas (Reis e Margis, 2001). Porém, só foi possível a seleção de clones que continham cDNAs para cistatinas pertencentes a três destes grupos: o clone SCSBHR1053A07.g (*cluster* SCEQRT1025E03.g) que contém o cDNA com a ORF de uma cistatina do grupo I (CaneCPI-2), o qual compreende cistatinas contendo a seqüência consenso N-terminal característica das fitocistatinas; o clone SCSFHR1043A02.g (*cluster* SCEPLR1051C09.g) contendo o cDNA com a ORF de uma cistatina do grupo II (CaneCPI-3), o qual agrupa cistatinas com uma extensão da região C-terminal, além de apresentarem também a seqüência consenso N-terminal; e o clone SCMCRT2087B02.g (*cluster* SCMCRT2087B02.g) contendo o cDNA com a ORF de uma cistatina do grupo III (CaneCPI-4), do qual fazem parte cistatinas que carecem da seqüência consenso N-terminal característica das fitocistatinas. Não foi possível encontrar clones que possuíssem uma fase aberta de leitura completa de cistatina pertencente ao grupo IV, as quais carecem do motivo conservado Gln-X-Val-X-Gly. Os clones SCSBHR1053A07 e SCSFHR1043A02 foram identificados em uma biblioteca de cDNAs gerada a partir de plantas infectadas com a bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HR1), enquanto que o clone SCMCRT2087B02 foi identificado em uma biblioteca de raiz (RT2) (Vettore *et al*, 2003).

As seqüências dos cDNAs contendo as ORFs das cistatinas da cana-de-açúcar, obtidas a partir do seqüenciamento dos clones de cDNA são mostradas abaixo. As regiões conservadas na superfamília cistatina estão em destaque na seqüência da proteína. As seqüências sublinhadas nas UTRs 3' correspondem ao sinal de poliadenilação.

### CaneCPI-2

```

----- UTR 5' -----
tttccggccccagttcgccccaatccaa  M  R  K  H  R  I  V  S
L  V  A  A  L  L  V  L  L  A  L  A  V  S  S
CTC GTG GCT GCC CTG CTC GTG CTG CTT GCC CTC GCC GTA TCG TCC
T  R  N  A  Q  E  E  S  M  A  L  A  G  G  I
ACC CGC AAC GCA CAA GAG GAG TCT ATG GCG TTG GCC GGC GGC ATC
K  D  V  P  A  N  E  N  D  L  H  L  Q  E  L
AAG GAC GTG CCG GCG AAC GAG AAC GAC CTC CAC CTC CAG GAG CTC
A  R  F  A  V  D  E  H  N  K  K  A  N  A  L
GCC CGC TTC GCC GTC GAT GAG CAC AAC AAG AAG GCC AAT GCT CTT
L  G  Y  E  K  L  V  K  A  K  T  Q  V  V  A
CTG GGG TAC GAG AAG CTT GTG AAG GCC AAG ACA CAA GTA GTT GCT
G  T  M  Y  C  L  T  V  E  V  K  D  G  E  V
GGC ACG ATG TAC TGT CTC ACT GTT GAG GTG AAG GAT GGC GAA GTC
K  K  L  Y  E  A  K  V  W  E  K  P  W  E  N
AAA AAG CTC TAT GAA GCT AAG GTC TGG GAG AAG CCA TGG GAG AAC
F  K  E  L  Q  E  F  K  P  V  E  E  G  A  S
TTC AAG GAG TTG CAA GAA TTC AAG CCT GTT GAA GAG GGT GCT AGC
A  #
GCC TAA ggtttctcgtctcacgtgcaatgtgctgctgaagcgcaaaacaaattttg
cagaataaaggaactgctttcagaacatgctagagcatgctcccttggtgtaatttcata
aaaaagtacagtgctcttaatgaaatatctttaaattttcg
----- UTR 3' -----

```



## CaneCPI-4

```

————— UTR 5' —————
cagcacctcatcccaaacc ATG TCC ACG AGA GCT CTT CTC CCG ACG CTG
L L L L V A A A A A A A R A G
CTC CTC CTG CTC GTC GCC GCC GCT GCC GCC GCG GCG CGT GCG GGG
A P A R P L A G G W F P I R N
GCC CCT GCA CGG CCG CTC GCC GGC GGG TGG TTC CCG ATC AGG AAC
V S D P H I Q E L G G W A V T
GTG AGC GAC CCG CAC ATC CAG GAG CTG GGC GGC TGG GCG GTG ACG
E H V R L A N D G L R F G E V
GAG CAC GTC AGG CTG GCC AAC GAC GGG CTG AGG TTC GGC GAG GTG
T S G E Q Q V V S G M N Y R L
ACG AGC GGG GAG CAG CAG GTG GTG TCC GGG ATG AAC TAC AGG CTC
V L D A T D A D G K L A A Y G
GTC CTC GAC GCC ACG GAC GCC GAC GGG AAG CTC GCG GCG TAC GGG
A F V Y E Q S W T N T R E L V
GCC TTC GTG TAC GAG CAG TCG TGG ACC AAC ACC CGC GAG CTC GTA
S F A S A D #
TCC TTC GCG TCG GCC GAC TGA tcgagaaccagctggacgtagttatcgcgca
cagcaattgCGTgcttggagcaacgtgtaattaagcaataataatgaaaataactgta
gtatataggacctcctagcatgcagacatgctcttgtgatcttgtctcgggtcgtgcag
actttaaaataaaagccatcttggcattatctgtactactatattaaagattattac
agtcctttctctcgattgcaaaaataaaaatatgatgtggaataacttcttntttacg
ttccatacacctacaacgcaa
————— UTR 3' —————

```

A **tabela 3.4** mostra o tamanho das ORFs, e as massas moleculares teóricas das cistatinas.

<b>Cistatina</b>	<b>Nucleotídeos</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Massa molecular (Da)</b>
<b>CaneCPI-2</b>	390	129	14.349,60
<b>CaneCPI-3</b>	786	261	27.909,88
<b>CaneCPI-4</b>	366	121	12.841,52

**Tabela 3.4: Tamanho das ORFs e massas moleculares das cistatinas.** Os valores são referentes às cistatinas contendo a seqüência do peptídeo sinal.

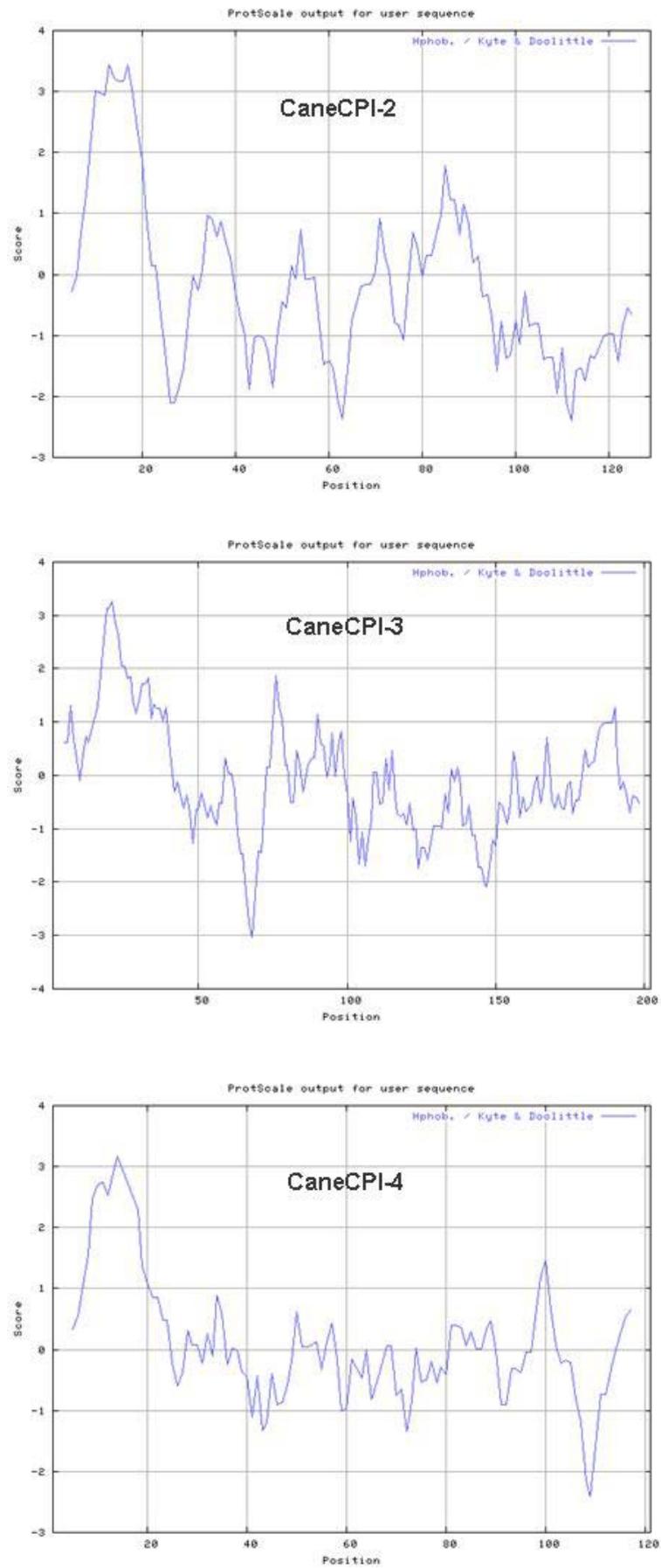
Estas ORFs codificam cistatinas provavelmente secretadas, uma vez que a análise realizada utilizando os programas PSORT e SignalP indicaram a provável localização extracelular das proteínas e a presença de uma seqüência característica de peptídeo sinal na região N-terminal (**Tabela 3.5**).

<b>Cistatina</b>	<b>Probabilidade de localização extracelular (PSORT)</b>	<b>Probabilidade de presença de peptídeo sinal (SignalP)</b>
<b>CaneCPI-2</b>	0,820	0,997
<b>CaneCPI-3</b>	0,820	0,999
<b>CaneCPI-4</b>	0,820	1,000

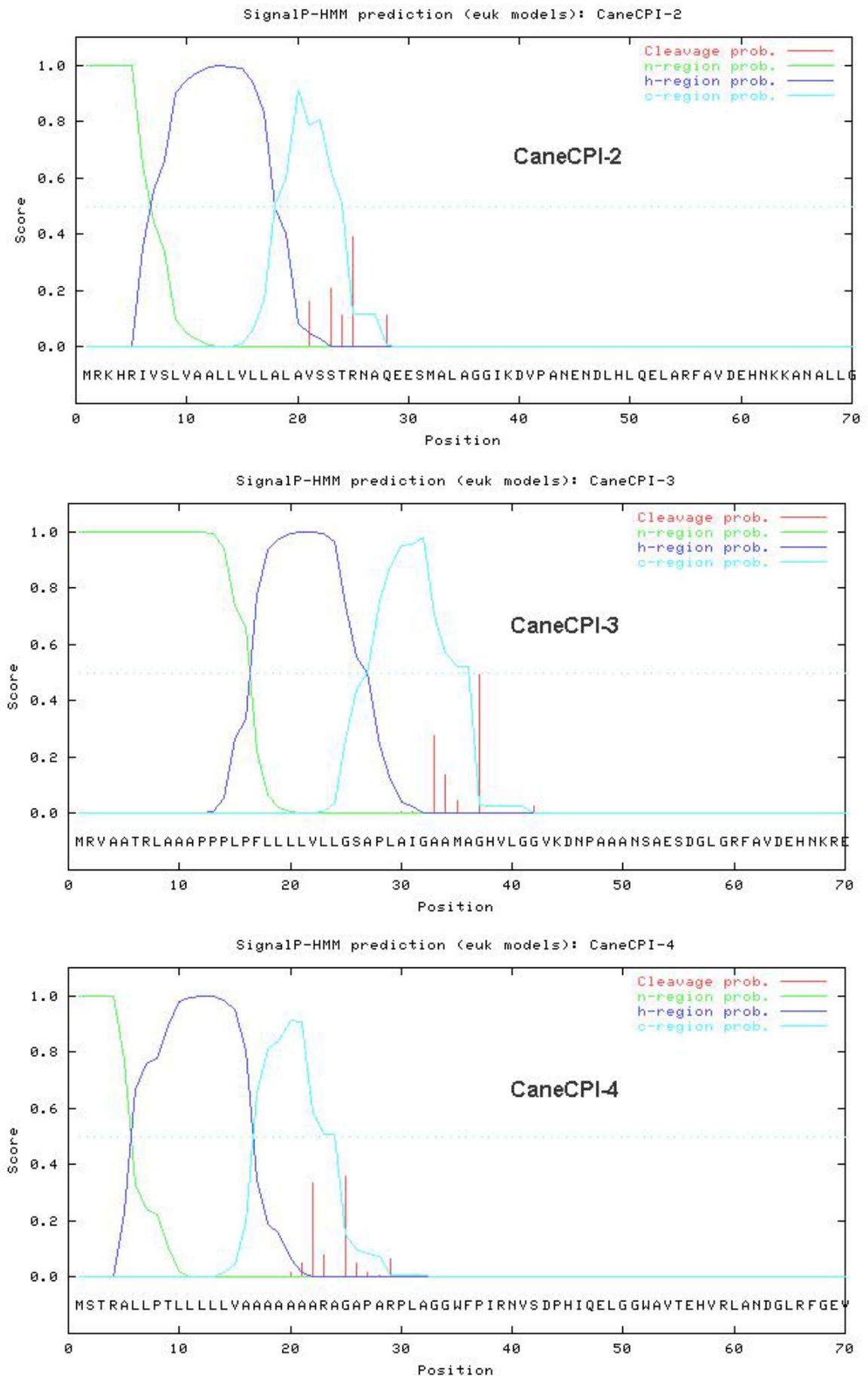
**Tabela 3.5: Probabilidades de localização extracelular e de presença de peptídeo sinal nas cistatinas.** Dados gerados com os programas PSORT e SignalP.

O peptídeo sinal é uma seqüência sinalizadora do endereçamento de algumas proteínas para o retículo endoplasmático, e possui algumas características bem definidas, tais como: (a) é constituído de 13 a 36 aminoácidos, (b) a parte N-terminal do sinal possui pelo menos um aminoácido carregado positivamente, (c) uma região altamente hidrofóbica forma o centro da seqüência sinalizadora, e (d) o aminoácido N-terminal do ponto de clivagem geralmente tem uma cadeia lateral

neutra pequena (Alberts *et al*, 2004). Os gráficos gerados com os programas ProtScale e SignalP revelaram a presença de uma região N-terminal altamente hidrofóbica nas seqüências das cistatinas, a qual apresenta as características de um peptídeo sinal (**Figuras 3.7 e 3.8**).

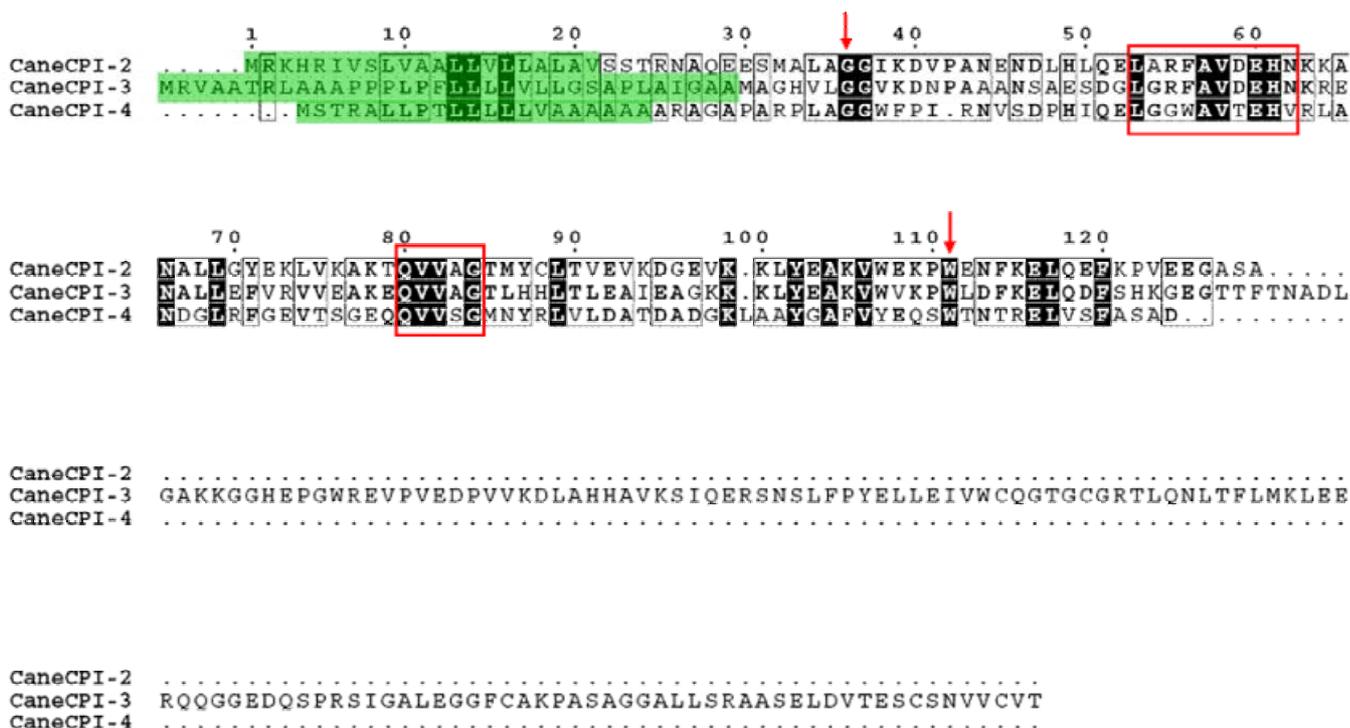


**Figura 3.7: Perfil de hidrofobicidade das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.** Os gráficos gerados com o programa ProtScale mostram a presença de uma região N-terminal altamente hidrofóbica nas seqüências das cistatinas, correspondente aos prováveis peptídeos sinais.



**Figura 3.8: Peptídeos sinais identificados nas seqüências das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e caneCPI-4.** Os gráficos gerados com o programa SignalP mostram a presença de seqüências com características de peptídeos sinais nas cistatinas. O provável sítio de clivagem do peptídeo sinal é mostrado em vermelho; as regiões N-terminal e C-terminal do peptídeo sinal são mostradas em verde e azul claro, respectivamente, e a região central altamente hidrofóbica, em azul escuro.

A **figura 3.9** mostra o alinhamento entre as seqüências das proteínas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4, gerado com a ferramenta ESPrpt (Gouet *et al*, 1999) do programa Multalin, destacando as prováveis seqüências sinalizadoras e as regiões conservadas nas fitocistatinas .

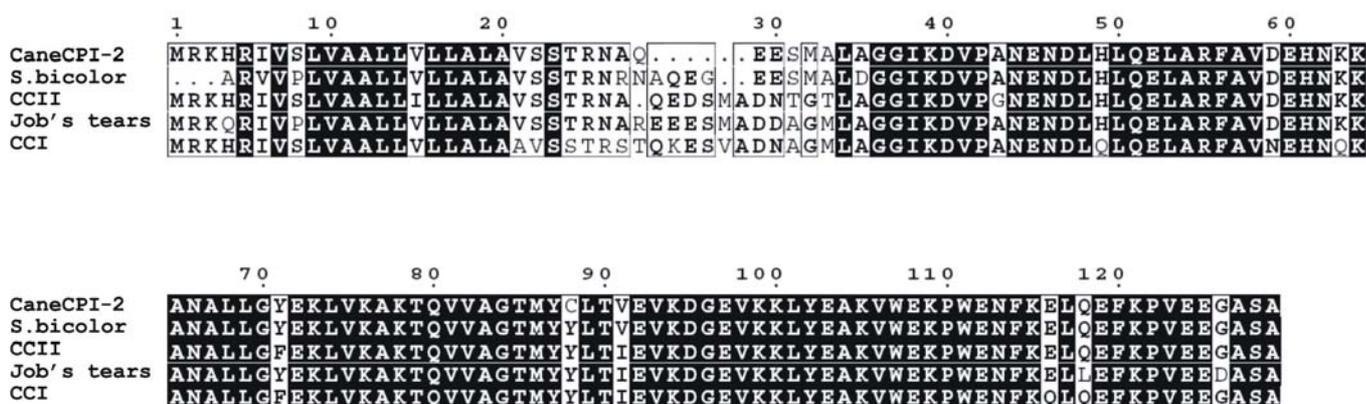


**Figura 3.9: Alinhamento das seqüências das proteínas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.** As seqüências de aminoácidos foram deduzidas das ORFs contidas nos clones SCSBHR1053A07 (CaneCPI-2), SCSFHR1043A02 (CaneCPI-3) e SCMCRT2087B02 (CaneCPI-4). As regiões destacadas em verde indicam as seqüências dos prováveis peptídeos sinais identificadas pelo programa SignalP. As setas e caixas vermelhas correspondem aos resíduos e motivos conservados nas cistatinas. As caixas pretas correspondem a 100% de identidade de aminoácidos. As caixas vazias correspondem à identidade em duas das três seqüências e o resíduo mais conservado é mostrado em negrito.

No banco de dados do NCBI estão depositadas seqüências de cistatinas de outras espécies vegetais. Algumas destas seqüências apresentam alta identidade de seqüência de aminoácidos com as cistatinas da cana-de-açúcar, conforme pode ser observado na **tabela 3.6 e figuras 3.10, 3.11 e 3.12.**

Cistatina da cana-de-açúcar	Cistatinas de outras espécies vegetais	% de identidade
CaneCPI-2	<i>Sorghum bicolor cystatin</i> (CAA60634)	93
	<i>corn cystatin II</i> (BAA09666)	91
	<i>Coix lacryma-jobi cystatin</i> (BAB21558)	90
	<i>corn cystatin I</i> (BAA01472)	85
CaneCPI-3	<i>Zea mays putative cystatin</i> (AM055633)	77
	<i>Oryza sativa japonica putative cystatin</i> (BAF04616)	70
	<i>Amaranthus hypochondriacus cystatin</i> (ABG89856)	69
	<i>Hordeum vulgare cystatin Hv-CPI4</i> (CAG38130)	67
CaneCPI-4	<i>Zea mays putative cystatin</i> (AM055635)	90
	<i>Oryza sativa japonica putative cystatin</i> (ABF96744)	70
	<i>Hordeum vulgare cystatin Hv-CPI8</i> (CAG38129)	69
	<i>Hordeum vulgare cystatin Hv-CPI6</i> (CAG38127)	60

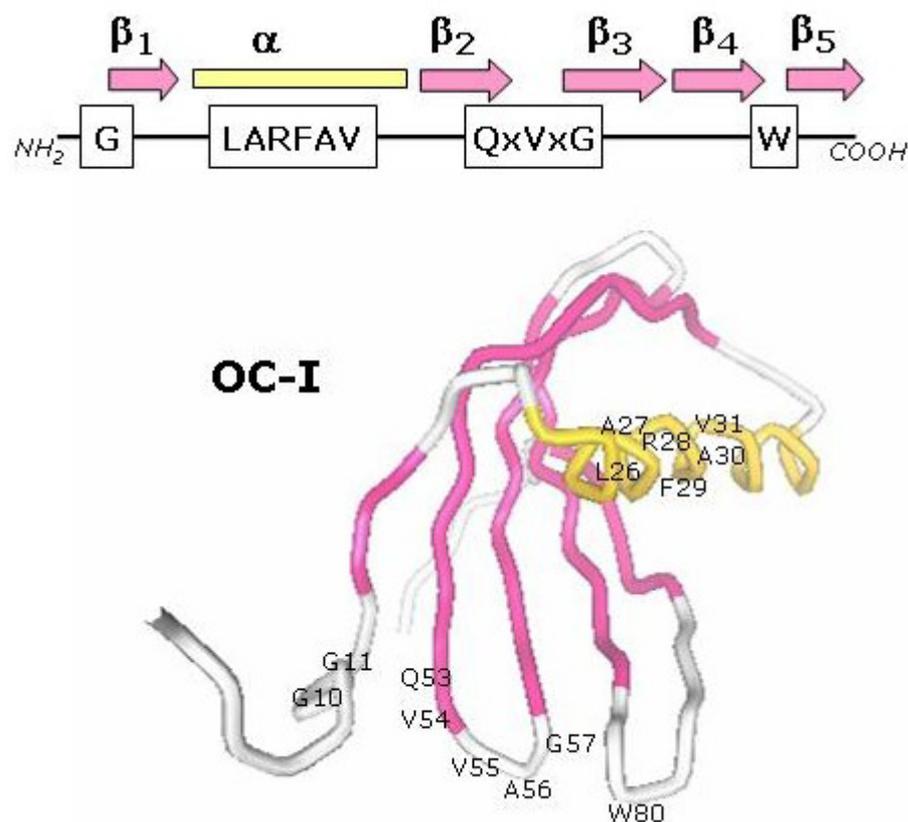
**Tabela 3.6: Identidade de seqüência de aminoácidos entre as cistatinas da cana-de-açúcar e cistatinas de outras espécies vegetais.** A porcentagem de identidade entre as seqüências foi obtida com o programa BLAST. Os números de acesso das seqüências no banco de dados NCBI estão entre parênteses.



**Figura 3.10: Alinhamento entre a cistatina CaneCPI-2 e outras fitocistatinas.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos da CaneCPI-2 com as cistatinas de outras espécies vegetais que apresentaram as maiores porcentagens de identidade na análise no programa BLAST. Os números de acesso das seqüências no banco de dados NCBI são: *Sorghum bicolor* (CAA60634), *Corn cystatin II* - CCII (BAA09666), *Job's tears* (BAB21558) e *Corn cystatin I* - CCI (BAA01472).

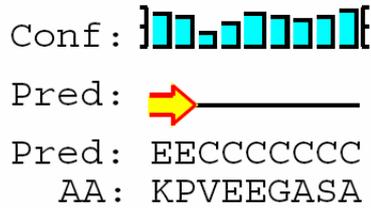
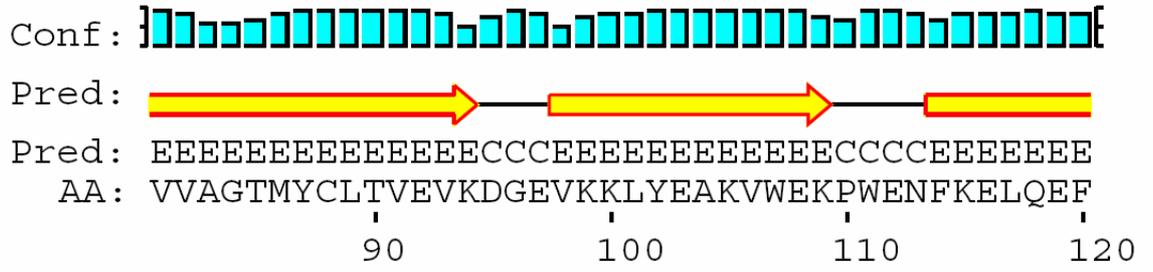
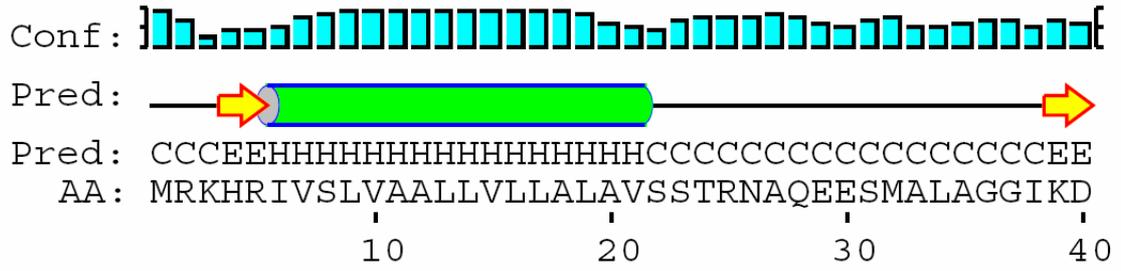


As fitocistatinas apresentam um padrão de elementos de estrutura secundária característico, conforme pode ser observado para a orizacistatina (OCI) na **figura 3.13**. De modo geral, nas estruturas secundárias das cistatinas da cana-de-açúcar preditas com o programa PSIPRED foi observado esse padrão (**Figura 3.14**). Em particular, a estrutura secundária da região C-terminal estendida da CaneCPI-3 é similar àquela predita para outras cistatinas que também possuem uma extensão da região C-terminal, com a região contendo o motivo conservado SNSL formando um *loop* entre uma  $\alpha$ -hélice e uma fita- $\beta$  (Martinez *et al*, 2007).

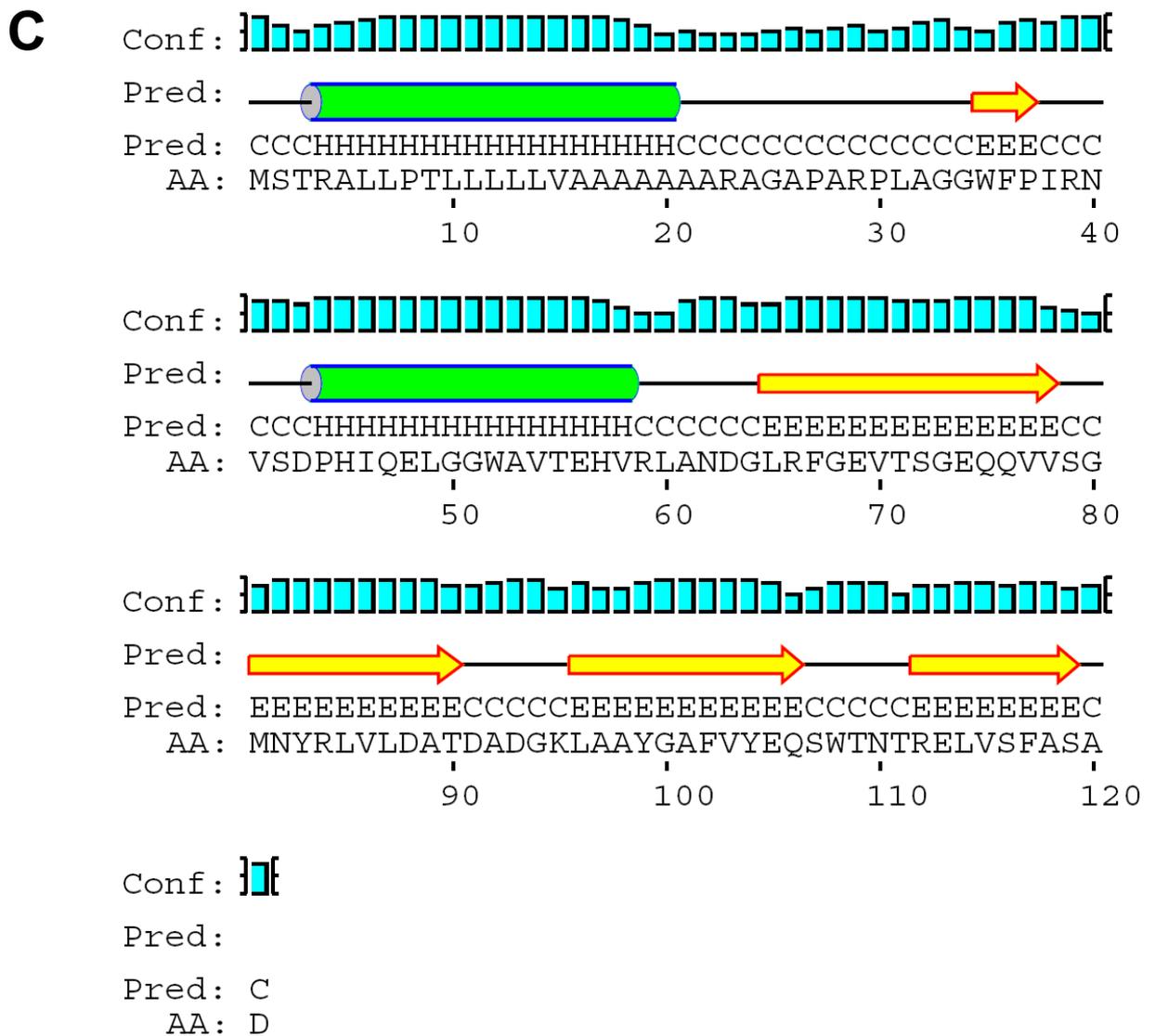


**Figura 3.13: Esquema das estruturas secundária e terciária da orizacistatina (OCI).** A figura mostra a presença de uma  $\alpha$ -hélice na região N-terminal contendo o motivo conservado nas fitocistatinas (LARFAV), além de cinco fitas- $\beta$  distribuídas ao longo da seqüência. Entre as fitas  $\beta_2$  e  $\beta_3$  forma-se um *loop* central contendo o motivo conservado (QxVxG) na superfamília, e entre as fitas  $\beta_4$  e  $\beta_5$ , um segundo *loop*, próximo à região C-terminal, contém o resíduo de triptofano também conservado na superfamília. Fonte: [www.biojournal.net/imagenes/articulos/2701.jpg](http://www.biojournal.net/imagenes/articulos/2701.jpg).

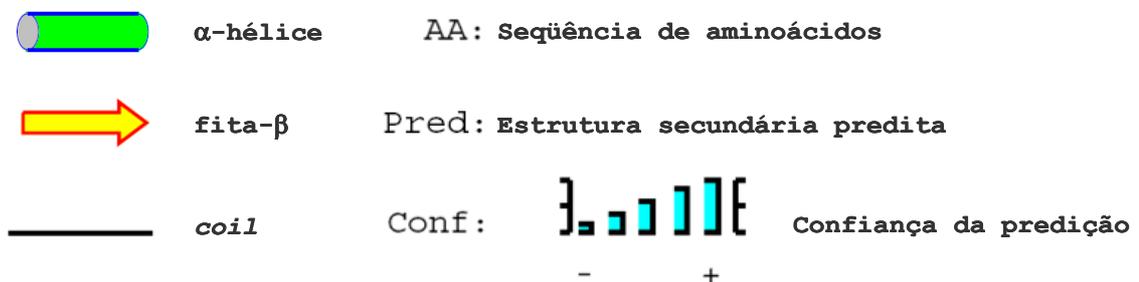
**A**





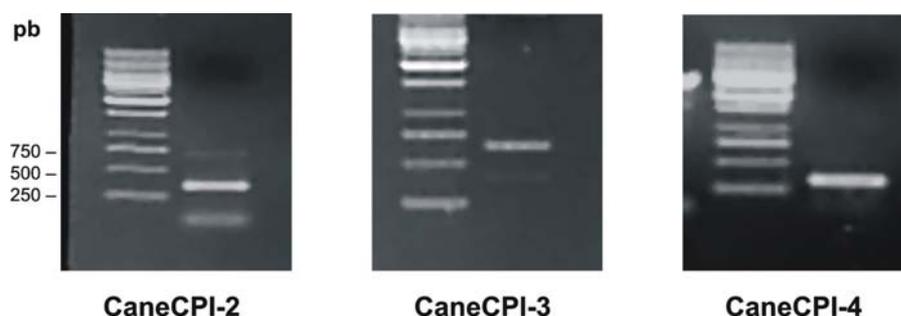


**Figura 3.14: Predição da estrutura secundária das cistatinas da cana-de-açúcar.** A predição foi realizada no programa PSIPRED. (A) CaneCPI-2, (B) CaneCPI-3 e (C) CaneCPI-4.



### 3.2.2 Amplificação das ORFs das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4

Estudos iniciais mostraram que a expressão e a solubilidade da cistatina CaneCPI-2 eram muito reduzidas, provavelmente devido à alta hidrofobicidade da seqüência sinal N-terminal. Assim, foi decidido expressar as cistatinas sem as seqüências correspondentes aos prováveis peptídeos sinais. Para isso, os *primers* utilizados nas reações de amplificação para o isolamento dos fragmentos foram desenhados de forma a excluir a seqüência codificadora do peptídeo sinal. As ORFs foram obtidas por PCR e a análise dos produtos das três amplificações em gel de agarose mostrou a presença do fragmento correspondente a cada uma das cistatinas nos respectivos tamanhos esperados (**Figura 3.15**).



**Figura 3.15: Amplificação das ORFs das cistatinas da cana-de-açúcar.** As ORFs das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 foram amplificadas por PCR a partir dos clones SCSBHR1053A07, SCSFHR1043A02 e SCMCRT2087B02, respectivamente, utilizando *primers* específicos.

A **tabela 3.7** mostra os tamanhos das ORFs e das proteínas sem os respectivos peptídeos sinais, além dos resultados obtidos com análise *in silico* das cistatinas recombinantes.

Cistatina	nt	Aa	Massa molecular (Da)	Índice de instabilidade	Coefficiente de extinção (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Abs (0,1%)
CaneCPI-2	330 <sup>(1)</sup>	109 <sup>(1)</sup>	12.21,87 <sup>(1)</sup>	32,99 <sup>(2)</sup>	15.470 <sup>(2)</sup>	1,076 <sup>(2)</sup>
		129 <sup>(2)</sup>	14.375,19 <sup>(2)</sup>			
CaneCPI-3	684 <sup>(1)</sup>	227 <sup>(1)</sup>	24.561,70 <sup>(1)</sup>	37,59 <sup>(2)</sup>	25.230 <sup>(2)</sup>	0,944 <sup>(2)</sup>
		247 <sup>(2)</sup>	26.725,02 <sup>(2)</sup>			
CaneCPI-4	306 <sup>(1)</sup>	101 <sup>(1)</sup>	10.910,3 <sup>(1)</sup>	26,79 <sup>(2)</sup>	20.970 <sup>(2)</sup>	1,604 <sup>(2)</sup>
		121 <sup>(2)</sup>	13.073,45 <sup>(2)</sup>			

**Tabela 3.7: Análise *in silico* das cistatinas recombinantes.** <sup>(1)</sup> Valores referentes às cistatinas sem a seqüência do peptídeo sinal; <sup>(2)</sup> Valores referentes às proteínas de fusão recombinantes (cistatinas sem a seqüência do peptídeo sinal + a seqüência derivada do vetor pET28a).

O índice de instabilidade é uma estimativa teórica da estabilidade de uma proteína. Proteínas cujos índices são menores do que 40 são preditas como estáveis, enquanto índices maiores do que 40 indicam que a proteína pode ser instável. Os índices obtidos predizem, portanto, as cistatinas como proteínas estáveis. O coeficiente de extinção molar indica quanta luz uma proteína absorve a um determinado comprimento de onda, e pode ser estimado a partir da seqüência de aminoácidos da proteína. Os valores de absorbância (0,1%), calculados a partir dos valores dos coeficientes de extinção, foram utilizados para estimar a concentração das cistatinas recombinantes puras, em adição ao método de Bradford.

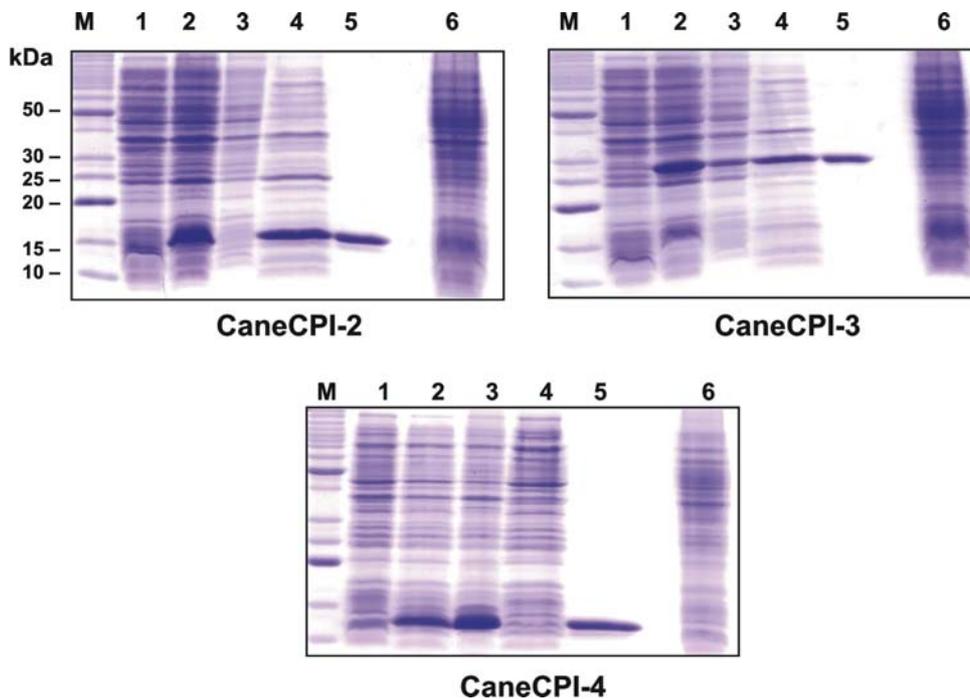
### 3.2.3 Expressão heteróloga e purificação das cistatinas recombinantes

As ORFs correspondentes às cistatinas foram subclonadas no vetor de expressão pET28a, e os vetores recombinantes foram posteriormente utilizados para a expressão heteróloga das cistatinas na cepa de *E. coli* Rosetta (DE3). A comparação dos perfis protéicos dos clones bacterianos induzidos e não induzidos por meio da análise em SDS-PAGE 15%, revelou a presença das bandas de

tamanhos esperados (His-Tag + cistatina) nos clones induzidos, referentes à superexpressão das cistatinas (**Figura 3.16, poços 1 e 2**).

Analisando em SDS-PAGE as frações solúveis e insolúveis resultantes da lise das bactérias, pôde-se observar que as cistatinas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 encontravam-se em sua maior parte na fração solúvel, enquanto a maior parte da cistatina CaneCPI-4 foi encontrada na fração insolúvel (**Figura 3.16, poços 3 e 4**). As frações solúveis foram então utilizadas para a purificação das cistatinas recombinantes por cromatografia de afinidade em colunas contendo resina de níquel, mesmo que apenas uma pequena porcentagem da proteína CaneCPI-4 estivesse em sua forma solúvel. Assim, as frações solúveis foram adicionadas às colunas e as proteínas foram eluídas em tampão de lise contendo imidazol. A análise em SDS-PAGE revelou que uma grande quantidade das proteínas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 foi eluída nas frações contendo 250 mM de imidazol. Embora uma pequena quantidade da proteína de fusão contendo a cistatina CaneCPI-4 encontrava-se na fração solúvel, esta foi capaz de se ligar à resina e também foi eluída na fração de 250 mM de imidazol (**Figura 3.16, poço 5**).

O rendimento das cistatinas puras foi de aproximadamente 20 mg por litro de cultura celular para CaneCPI-2 e CaneCPI-3, e de aproximadamente 2 mg por litro de cultura celular para CaneCPI-4. As frações contendo as cistatinas foram dialisadas em tampão PBS e esterilizadas em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de serem utilizadas nos ensaios experimentais.



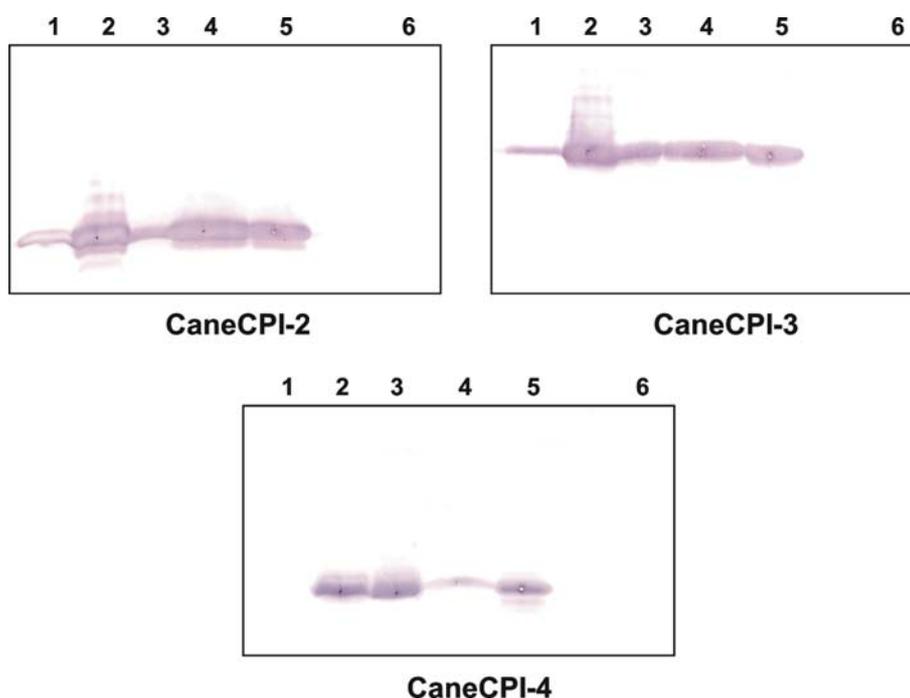
**Figura 3.16: Expressão heteróloga e purificação das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4.** Análise em SDS-PAGE 15% das amostras coletadas da cultura não induzida (1) e induzida (2), das frações insolúvel (3) e solúvel (4) resultante da lise celular, e da purificação em coluna de níquel (5). 6: amostra coletada da indução de uma cultura de bactérias hospedeiras do vetor pET28a. M: marcador de peso molecular (Invitrogen)

**OBS:** A subclonagem da ORF da cistatina CaneCPI-3 e a padronização da expressão e da purificação da proteína, fizeram parte do trabalho de iniciação científica da aluna de graduação Wendy Martin Rios.

### 3.2.4 Detecção das cistatinas recombinantes e das cistatinas endógenas da cana-de-açúcar

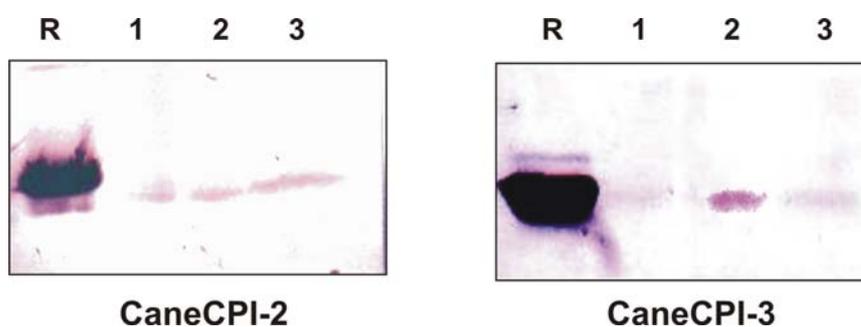
Os anticorpos policlonais gerados em camundongos a partir das cistatinas recombinantes foram testados em um ensaio de *Western blot*. As amostras coletadas da cultura não induzida e induzida, das frações resultantes da lise celular e das frações eluídas na purificação para cada cistatina foram aplicadas igualmente

em dois géis de poliacrilamida. Um deles foi corado com o corante azul de Coomassie (**Figura 3.16**) e o outro foi utilizado no ensaio de *Western blot*. Neste caso, as amostras separadas por eletroforese foram transferidas para membranas de nitrocelulose, as quais foram então incubadas com os respectivos anticorpos policlonais, e posteriormente, com o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado à fosfatase alcalina. As bandas das proteínas que reagiram com os anticorpos foram reveladas utilizando-se o substrato para a fosfatase alcalina. Através da análise das membranas pôde-se concluir que os anticorpos policlonais anti-CaneCPI-2, anti-CaneCPI-3 e anti-CaneCPI-4 eram específicos para as respectivas proteínas recombinantes (**Figura 3.17**).



**Figura 3.17: Detecção das cistatinas recombinantes pelos anticorpos policlonais.** Uma réplica dos géis de poliacrilamida mostrados na figura 3.16 foi transferida para membrana de nitrocelulose. A detecção das cistatinas recombinantes foi realizada utilizando os respectivos anticorpos policlonais gerados em camundongo e o anticorpo secundário conjugado à enzima fosfatase alcalina. **1, 2, 3, 4, 5 e 6:** idem figura 3.16.

Os anticorpos policlonais gerados contra as cistatinas recombinantes CaneCPI-2 e CaneCPI-3 foram utilizados para detectar a expressão destas cistatinas em diferentes tecidos de plantas de cana-de-açúcar. A análise do *Western blot* revelou que os anticorpos anti-CaneCPI-2 e anti-CaneCPI-3 foram capazes de detectar bandas de proteínas de massas moleculares esperadas para estas duas cistatinas em extratos protéicos de tecidos de folha, meristema e raiz (**Figura 3.18**). Em geral, as cistatinas endógenas foram detectadas uniformemente nos três tecidos analisados, permitindo verificar a expressão destas cistatinas na planta. Apesar de as intensidades das bandas detectadas serem baixas comparadas àquelas das proteínas recombinantes, os anticorpos parecem ser altamente específicos, já que bandas inespecíficas não foram observadas.

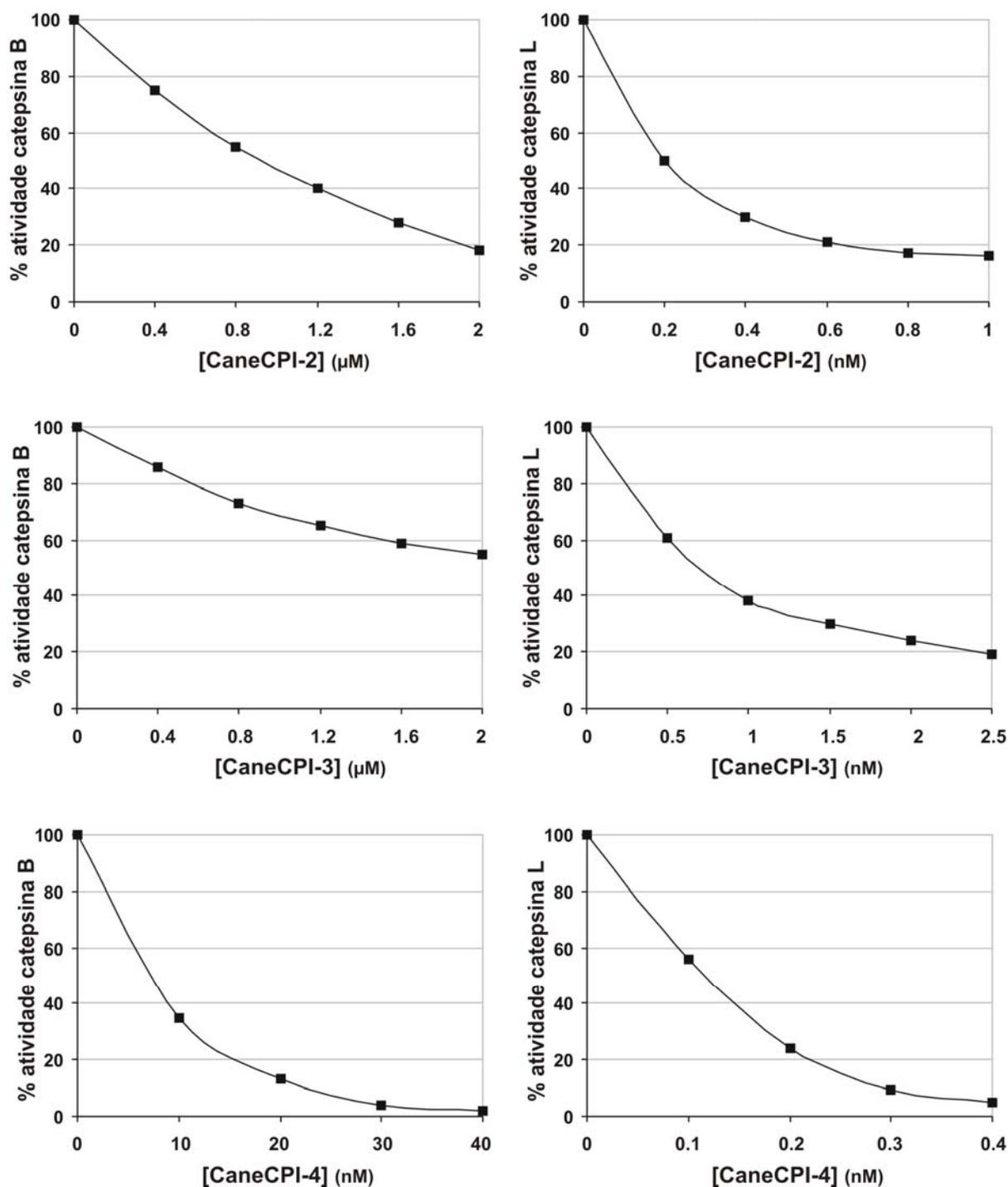


**Figura 3.18: Detecção das proteínas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 endógenas.** Amostras protéicas de tecidos da cana-de-açúcar foram analisadas em ensaio de *Western blot* utilizando os anticorpos policlonais gerados contra as cistatinas recombinantes. **R:** cistatina recombinante; **1:** folha; **2:** meristema; **3:** raiz.

### 3.2.5 Inibição das catepsinas B e L humanas pelas cistatinas recombinantes

A atividade inibitória das cistatinas contra as catepsinas B e L foi medida em espectrofluorímetro Hitachi F2000, utilizando-se o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA. Os resultados sumarizados na **figura 3.19** mostram que as cistatinas recombinantes apresentaram diferenças nas atividades inibitórias contra as enzimas.

Enquanto as três cistatinas inibiram a atividade da catepsina L, somente a cistatina CaneCPI-4 foi capaz de inibir eficientemente a atividade da catepsina B.



**Figura 3.19: Inibição das catepsinas B e L humanas pelas cistatinas recombinantes.** A atividade inibitória das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 contra as catepsinas B e L humanas foi medida em um ensaio fluorimétrico utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA. A atividade residual da enzima foi calculada a partir dos *slopes* das retas gerados com o programa FL Solutions 2.0, e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ausência da cistatina).

A constante de inibição aparente ( $K_i$  app) indica a concentração de inibidor necessária para a diminuição de 50% da velocidade de hidrólise do substrato pela enzima. Para um inibidor ser considerado potente, a afinidade deste por sua enzima alvo deve ser tão alta que o seu valor de  $K_i$  app é menor ou igual à concentração total de enzima utilizada no ensaio de inibição (Copeland, 2005). Considerando os valores de  $K_i$  app encontrados para a inibição das catepsinas B e L pelas cistatinas da cana-de-açúcar (**Tabela 3.8**), bem como as concentrações das catepsinas utilizadas nos ensaios (0,5 e 1 nM, respectivamente), pode-se concluir que as cistatinas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 apresentam alto poder inibitório contra catepsina L, porém não são capazes de inibir de forma eficiente a catepsina B. Já a cistatina CaneCPI-4 apresenta uma considerável atividade inibitória tanto contra a catepsina L como contra a catepsina B.

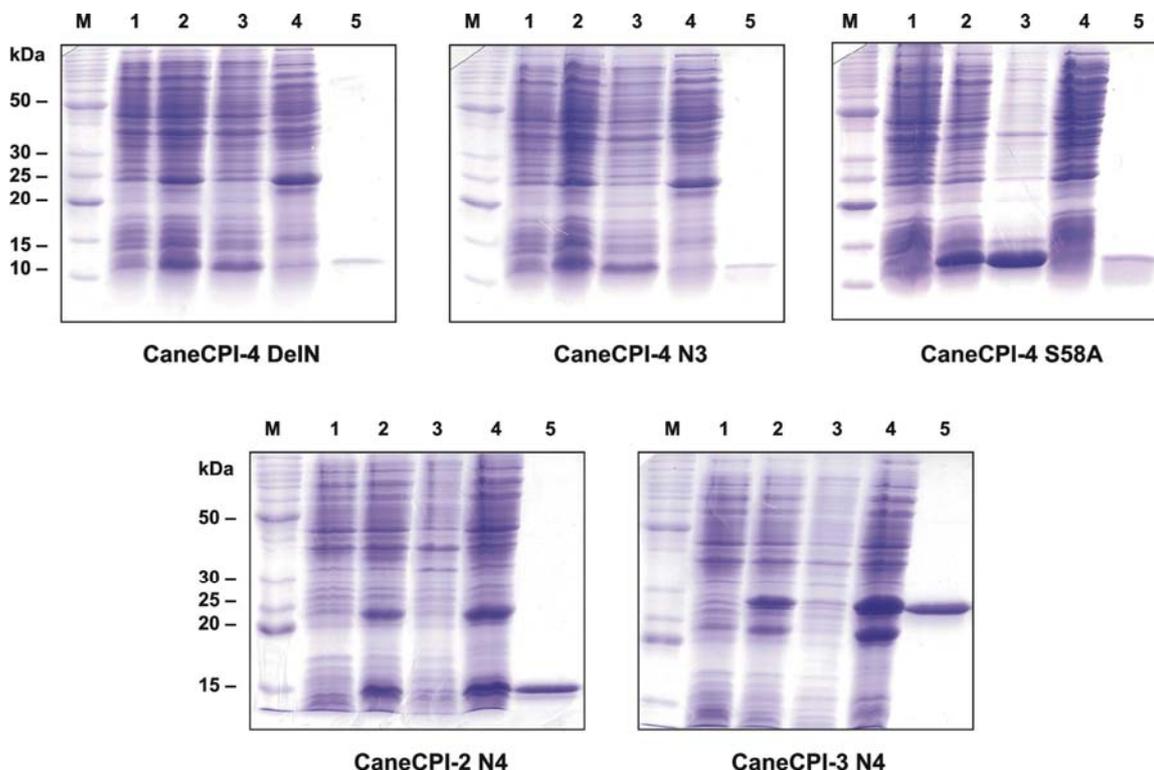
Cistatina	$K_i$ app	
	catepsina B	catepsina L
<b>CaneCPI-2</b>	0,47 $\mu$ M	0,17 nM
<b>CaneCPI-3</b>	2,44 $\mu$ M	0,6 nM
<b>CaneCPI-4</b>	0,83 nM	0,021 nM

**Tabela 3.8: Constantes de inibição aparente ( $K_i$  app) das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 contra as catepsinas B e L.** As constantes de inibição aparente dos complexos enzima-inibidor foram calculadas segundo o procedimento de Morrison, utilizando o programa GraFit.

### 3.2.6 Atividade inibitória das formas mutantes das cistatinas

As formas mutantes das cistatinas da cana-de-açúcar foram obtidas de forma recombinante. As ORFs correspondentes às formas mutantes foram subclonadas no vetor de expressão pET28a, e os vetores recombinantes foram então utilizados para

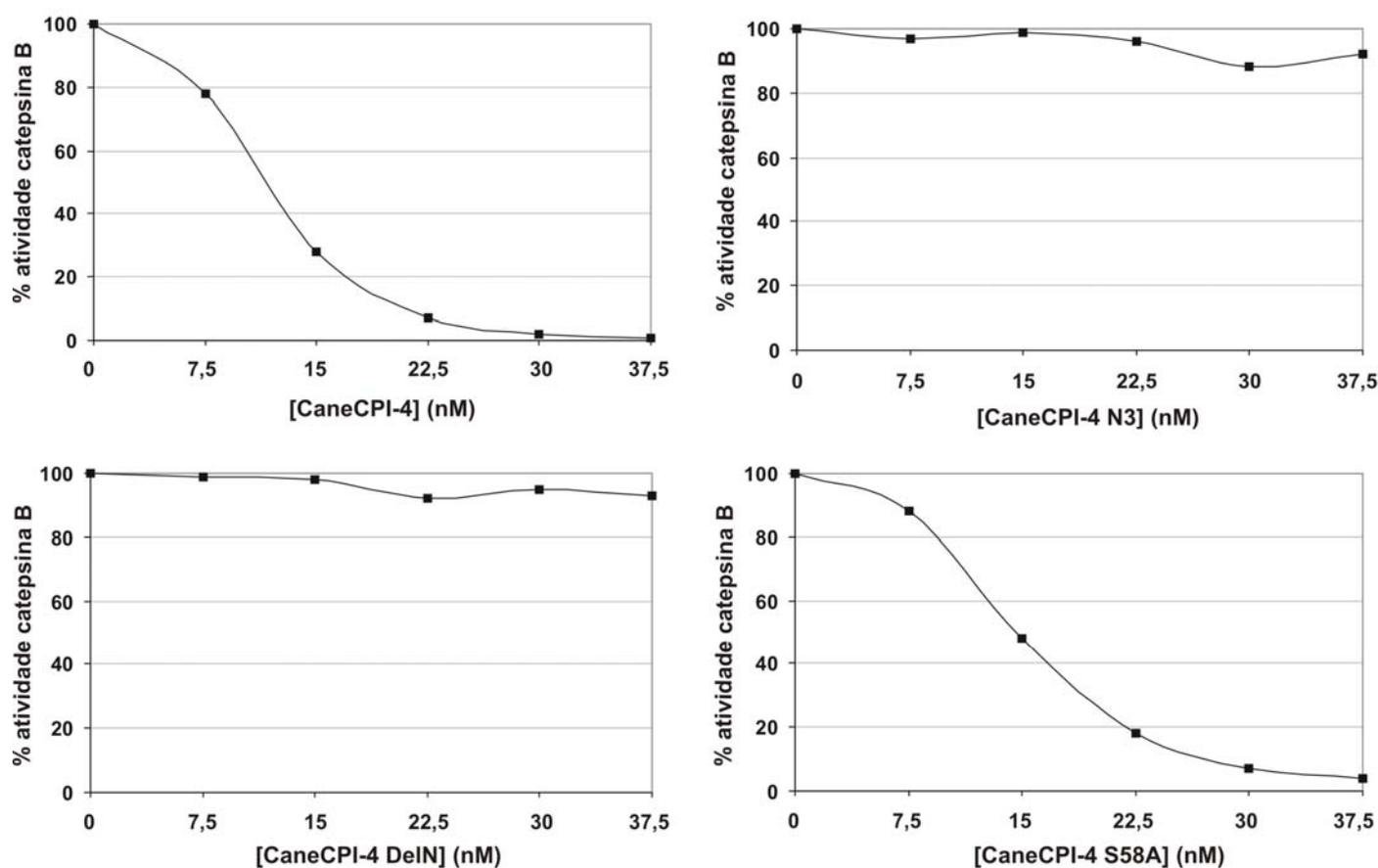
a expressão heteróloga destas cistatinas na cepa de *E. coli* Rosetta (DE3). Posteriormente, as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade. A **figura 3.20** mostra a análise da expressão e purificação das cistatinas mutantes.



**Figura 3.20: Expressão heteróloga e purificação das formas mutantes das cistatinas.** Análise em SDS-PAGE 15% das amostras coletadas da cultura não induzida (1) e induzida (2), das frações insolúvel (3) e solúvel (4) resultantes da lise celular, e da purificação em coluna de níquel (5). **M:** marcador de peso molecular (Invitrogen).

A atividade inibitória das formas mutantes das cistatinas foi testada contra as catepsinas B e L humanas. Os mutantes CaneCPI-4 DelN e CaneCPI-4 N3 perderam a atividade inibitória contra a catepsina B, enquanto o mutante CaneCPI-4 S58A apresentou uma diminuição de aproximadamente 30% na atividade inibitória contra a mesma enzima quando comparados à atividade inibitória da cistatina CaneCPI-4 selvagem (**Figura 3.21**). Estes mutantes mantiveram a mesma atividade

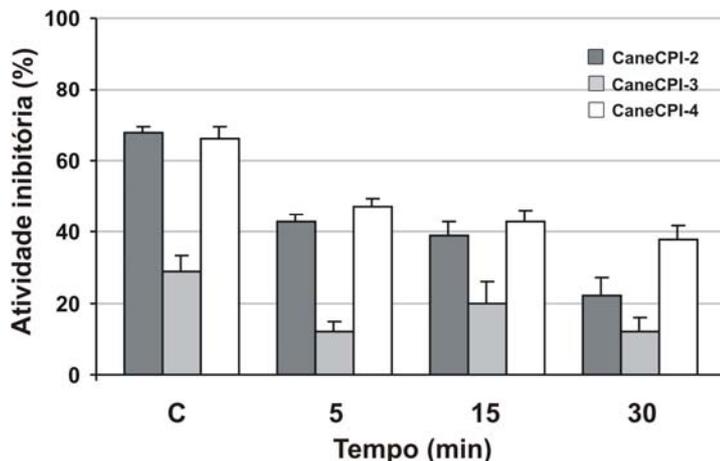
inibitória contra a catepsina L em relação à forma selvagem. Já os mutantes CaneCPI-2 N4 e CaneCPI-3 N4, em geral mantiveram as mesmas atividades inibitórias contra as catepsinas B e L que as apresentadas pelas cistatinas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 selvagens. A atividade inibitória do mutante CaneCPI-4 N2 não pôde ser testada, uma vez que não foi possível a obtenção desta proteína em forma pura.



**Figura 3.21: Inibição da catepsina B humana pelas formas mutantes das cistatinas.** A atividade inibitória da cistatina CaneCPI-4 e das suas formas mutantes CaneCPI-4 N3, CaneCPI-4 DeIN e CaneCPI-4 S58A 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 a partir dos *slopes* das retas gerados com o programa FL Solutions 2.0, e expressa como porcentagem de atividade em relação ao controle (ausência da cistatina).

### 3.2.7 Estabilidade das cistatinas recombinantes

A atividade inibitória das cistatinas recombinantes foi testada quanto à resistência a altas temperaturas e quanto às condições e temperaturas de armazenamento. Após serem submetidas à temperatura de 100°C por 5 minutos as cistatinas apresentaram uma redução de aproximadamente 20% em sua atividade inibitória (**Figura 3.22**). Embora essa redução na atividade das cistatinas tenha se acentuado levemente com o tempo de aquecimento, após 30 minutos as cistatinas ainda apresentavam uma atividade inibitória de 30 a 60% em relação à atividade apresentada pelas cistatinas controle (não submetidas à fervura). Esses resultados confirmam os dados da literatura que relatam a alta estabilidade térmica das cistatinas quando submetidas a altas temperaturas (Arai *et al*, 2002).



**Figura 3.22: Estabilidade térmica das cistatinas da cana-de-açúcar recombinantes.** Após serem submetidas à temperatura de 100°C durante 5, 15 e 30 minutos, as cistatinas (2 nM) foram testadas em um ensaio de inibição contra a enzima papaína (50 nM) utilizando um espectrofluorímetro. A atividade inibitória, expressa como porcentagem, foi obtida da diferença entre a atividade residual da papaína na ausência das cistatinas (considerada 100%) e a atividade residual da enzima na presença das cistatinas não submetidas à fervura (**C**) ou submetidas à fervura por 5, 15 ou 30 min. Cada medida foi realizada em triplicata. Os valores são expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes.

Quanto às condições e temperaturas de armazenamento, em geral as cistatinas permaneceram estáveis por 3 meses, sem perdas consideráveis da atividade inibitória independentemente de se eram armazenadas a 4, - 20 ou - 80°C, ou na presença ou ausência de glicerol.

### 3.3 DISCUSSÃO

O projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST) gerou um banco de dados com aproximadamente 238.000 ESTs obtidas por meio do sequenciamento de mais de 260.000 clones de cDNA de 26 bibliotecas geradas a partir de diferentes tecidos da planta (Vettore *et al*, 2003). A partir do banco de dados SUCEST, Reis e Margis identificaram 25 *clusters* consenso para possíveis cistatinas da cana-de-açúcar, os quais, segundo uma análise filogenética, foram agrupados em 4 grupos (Reis e Margis, 2001). As três cistatinas escolhidas para este trabalho possuem características distintas, uma vez que pertencem a grupos diferentes.

A cistatina CaneCPI-2 (Grupo I; clone SCSBHR1053A07.g; *cluster* SCEQRT1025E03.g) apresenta as características típicas de uma fitocistatina, ou seja, além das regiões conservadas na superfamília cistatina, possuem a seqüência consenso na região N-terminal característica das cistatinas de planta. A CaneCPI-3 (Grupo II; clone SCSFHR1043A02.g; *cluster* SCEPLR1051C09.g) apresenta as características de uma fitocistatina, porém possui uma extensão da região C-terminal. Outras fitocistatinas com a extremidade C-terminal estendida têm sido descritas (Shyu *et al*, 2004; Martinez *et al*, 2005; Yang e Yeh, 2005), contudo, esta região tem sido pouco investigada. Um estudo recente, entretanto, demonstrou que o fragmento correspondente à região C-terminal estendida presente na cistatina da cevada (*Hordeum vulgare*) foi capaz de inibir a enzima humana legumaina, uma vez que esta região possui o motivo SNSL similar àquele envolvido na inibição de cisteíno proteases do tipo legumaina por cistatinas humanas (Martinez *et al*, 2007). Assim, sugere-se que as cistatinas que possuem esta extensão do C-terminal possuem uma função adicional de inibição de cisteíno proteases do tipo legumaina, além da função de inibição de cisteíno proteases do tipo papaína. Já a cistatina

CaneCPI-4 (Grupo III; clone SCMCRT2087B02.g; *cluster* SCMCRT2087B02.g) apresenta as regiões conservadas na superfamília, mas a região N-terminal característica das fitocistatinas não está conservada.

Como a Canacistatina havia sido expressa e purificada eficientemente utilizando o vetor pET28a (Soares-Costa *et al*, 2002), no presente trabalho foi adotada a mesma estratégia para a obtenção das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4. A análise *in silico* indicou a presença de um peptídeo sinal na seqüência das cistatinas e a provável localização extracelular destas. Desde que um estudo inicial, neste trabalho, mostrou que a expressão e a solubilidade da cistatina CaneCPI-2 eram muito reduzidas, provavelmente devido à alta hidrofobicidade da seqüência sinal N-terminal, foi decidido expressar as cistatinas sem as seqüências correspondentes aos prováveis peptídeos sinais. Desta forma, obteve-se um alto nível de expressão das três cistatinas em *E. coli*. No entanto, elas apresentaram diferenças quanto à solubilidade. Uma pequena porcentagem da cistatina CaneCPI-4 foi obtida em sua forma solúvel, resultando em um baixo rendimento de proteína pura (~ 2 mg/L de cultura) quando comparado às cistatinas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 (~ 20 mg/L de cultura). O conteúdo de resíduos hidrofóbicos nos elementos de estrutura secundária, no entanto, é similar entre as cistatinas. Por último, a possibilidade do enovelamento incorreto como causa da insolubilidade da proteína foi descartada, uma vez que a expressão a 30°C não aumentou a solubilidade, e ainda, reduziu o nível de expressão da cistatina (resultados não mostrados).

Para facilitar a purificação, as cistatinas foram expressas em fusão com uma “cauda” de histidinas na extremidade N-terminal. A purificação por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel foi bastante eficiente, já que a obtenção das cistatinas puras foi possível com um único passo de purificação. A presença da

“cauda” de histidinas na extremidade N- ou C-terminal das cistatinas não influenciou na atividade inibitória destas. Isso foi verificado por meio de construções nas quais os genes das cistatinas foram subclonados de forma a produzir a proteína recombinante contendo a His-tag na região C-terminal (resultados não mostrados). Este fato é particularmente relevante, pois a região N-terminal das cistatinas é importante para sua interação com a cisteína protease alvo e mudanças nesta região poderiam modificar a atividade da cistatina. No entanto, ficou claro que a fusão da His-tag no N-terminal não alterou a capacidade inibitória das diferentes CaneCPIs. Isso pode ser explicado pelo fato de o peptídeo adicionado ser relativamente pequeno (20 aminoácidos) quando comparado a outros peptídeos, como por exemplo, a proteína GST (Glutathione S-transferase) ou a tiorredoxina. Neste caso, o peptídeo geralmente tem que ser removido da proteína de fusão com o uso de proteases, o que pode levar à clivagem intramolecular (Ohtsubo *et al*, 2005) ou digestão parcial (Yang e Yeh, 2005) da proteína recombinante.

A obtenção das cistatinas recombinantes puras possibilitou a produção dos anticorpos policlonais em camundongos. Análises de *Western blot* revelaram que estes anticorpos são específicos para as cistatinas recombinantes, além de serem capazes de detectar as cistatinas endógenas em diferentes tecidos da cana-de-açúcar. Embora tenha sido específica, a detecção das cistatinas endógenas ocorreu em baixa intensidade, o que pode ser atribuído à baixa expressão, ou então, à expressão dependente de estímulo externo, como por exemplo, o ataque de patógenos ou ferimento mecânico. Enfim, a disponibilidade destes anticorpos certamente contribuirá para futuros estudos, como por exemplo, análise da expressão das cistatinas durante o desenvolvimento da planta, ou em diferentes condições, tais como, estresse hídrico, plantas saudáveis vs plantas infectadas, etc.

A característica das cistatinas de serem estáveis a altas temperaturas foi confirmada para as cistatinas da cana-de-açúcar recombinantes, uma vez que estas ainda apresentavam 30 a 60% da atividade inibitória depois de 30 min a 100°C. O mesmo já tinha sido observado para a Orizacistatina, uma cistatina de arroz, cuja atividade inibitória permanece inalterada após 30 min a 100°C (Arai *et al*, 2002). As cistatinas recombinantes também se mostraram muito estáveis com o tempo. Independentemente das condições e temperaturas de armazenamento, elas apresentaram atividade inibitória inalterada por três meses.

As diferenças observadas na solubilidade das cistatinas da cana-de-açúcar expressas em *E. coli* refletem possíveis diferenças conformacionais decorrentes das diferenças estruturais entre as proteínas. No entanto, a capacidade de inibir a atividade enzimática das catepsinas, além de outras cisteíno proteases, indica que as cistatinas recombinantes estão em sua conformação correta. Além disso, as diferenças conformacionais poderiam estar associadas aos diferentes perfis de atividades inibitórias e especificidades contra cisteíno proteases. Assim, embora as três cistatinas inibam eficientemente a catepsina L, somente a CaneCPI-4 foi capaz de inibir a atividade da catepsina B, com um  $K_i$  comparável ao da cistatina C humana e ao da cistatina do ovo de galinha (Barrett *et al*, 1986b).

Comparada a outras cisteíno proteases, a catepsina B contém um elemento estrutural extra, denominado *loop* de oclusão (“*occluding loop*”), o qual bloqueia a fenda do sítio ativo (Musil *et al*, 1991). Como as cistatinas inibem as catepsinas através de ligação competitiva ao sítio ativo, a conformação deste *loop* na catepsina B é incompatível com a ligação das cistatinas. Essa influência do *loop* na acessibilidade ao sítio ativo é refletida em valores altos de  $K_i$  para a maioria das cistatinas, quando comparados àqueles obtidos contra cisteíno proteases que

carecem de tal *loop* (Barrett *et al* 1986b; Kondo *et al*, 1990; Abrahamson, 1994; Ohtsubo *et al*, 2005; Martinez *et al*, 2005).

A cistatina C, um inibidor natural de catepsina B, é capaz de inibir eficientemente a atividade desta enzima com um  $K_i$  de 0,25 nM (Barrett *et al*, 1986b). A inibição ocorre por um mecanismo de dois passos, o qual requer um deslocamento do *loop* de oclusão. No primeiro passo ocorre uma interação inicial da região N-terminal da cistatina com os subsítios S2 e S3 do sítio ativo da enzima. No passo seguinte há o deslocamento do *loop* de oclusão conforme a cistatina ancorada introduz os seus dois *loops*, o central e o da região C-terminal, nos subsítios S' (Nycander *et al*, 1998; Pavlova *et al*, 2000). Alguns autores sugerem que a eficiência na inibição da catepsina B está relacionada ao segmento N-terminal da cistatina. Por exemplo, as afinidades da cistatina C e da cistatina do ovo de galinha com a catepsina B foram grandemente diminuídas, principalmente devido a uma redução nas constantes de associação, depois da remoção da região N-terminal localizada antes do resíduo de glicina conservado (Abrahamson *et al*, 1991; Björk *et al*, 1994). Neste sentido, o segmento N-terminal da cistatina D seria menos favorável para a interação inicial do que o segmento da cistatina C. De fato, uma variante de cistatina C com o segmento N-terminal da cistatina D apresentou uma afinidade 30 vezes menor à catepsina B quando comparada à cistatina C original (Hall *et al*, 1998). Por outro lado, a substituição do segmento N-terminal da cistatina D pelo segmento da cistatina C não foi capaz de alterar a inabilidade de inibir a catepsina B (Hall *et al*, 1998). A explicação mais provável é que, apesar de apresentar o segmento N-terminal da cistatina C, mais efetivo na ancoragem inicial, a cistatina D falhou em deslocar o *loop* de oclusão e se ligar à protease por meio de seus dois *loops* (Hall *et al*, 1998). Resultados similares foram obtidos com os mutantes das

cistatinas da cana-de-açúcar, já que as variantes CaneCPI-4 delN e CaneCPI-4 N3 perderam a atividade inibitória contra a catepsina B, enquanto as variantes CaneCPI-2 N4 e CaneCPI-3 N4 mantiveram-se incapazes de inibir a enzima. Como o N-terminal da CaneCPI-4 mostrou-se essencial para a inibição da catepsina B, porém não suficiente para melhorar a atividade inibitória em outras cistatinas, nossos resultados indicam que a atividade inibitória da CaneCPI-4 contra a catepsina B também ocorreria por um mecanismo de dois passos, o qual depende não apenas do N-terminal, mas de toda a estrutura.

A cistatina encontrada no ovo de galinha também é capaz de inibir eficientemente a catepsina B, com um valor de  $K_i$  de 1,7 nM (Barrett *et al*, 1986b). O motivo conservado na superfamília cistatina Q-X-V-X-G é Q-V-V-A-G em CaneCPI-2 e CaneCPI-3, mas Q-V-V-S-G em CaneCPI-4, assim como em outras cistatinas do Grupo III (Reis and Margis, 2001) e na cistatina do ovo de galinha. Interessantemente, a substituição da serina por alanina (S→A) no motivo Q-X-V-X-G da cistatina do ovo de galinha reduziu a inibição da catepsina B (Auerswald *et al*, 1992). Uma variante similar da cistatina da cana-de-açúcar CaneCPI-4 (CaneCPI-4 S58A), construída por meio de mutação sítio-dirigida, apresentou uma redução de ~30% na atividade inibitória contra a catepsina B, indicando que a serina presente no *loop* da região C-terminal seria importante para o segundo passo da inibição.

As catepsinas participam em vários processos fisiológicos, tais como, processamento e apresentação de antígenos, remodelamento ósseo, cicatrização, entre outros (McGrath, 1999; Turk *et al*, 2000; Dickinson, 2002). Elas também estão envolvidas em uma variedade de processos patológicos, incluindo osteoporose, artrite reumatóide, osteoartrite e câncer (Turk *et al*, 2000; Vasiljeva *et al*, 2007). Neste sentido, seria interessante testar a atividade inibitória das cistatinas da cana-

de-açúcar contra outras catepsinas. Por último, nossos resultados sugerem que a procura de inibidores de proteases nas diferentes espécies vegetais para as quais existem dados de seqüência é uma estratégia a ser considerada em estudos futuros.

## **CAPÍTULO 2**

**Efeito das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4  
sobre a invasão de células de câncer mamário  
humano MDA-MB-231**

## **4 CAPÍTULO 2**

Este capítulo descreve o efeito das cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 sobre os processos de proliferação, adesão, migração e invasão das células da linhagem de câncer mamário humano MDA-MB-231.

## 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

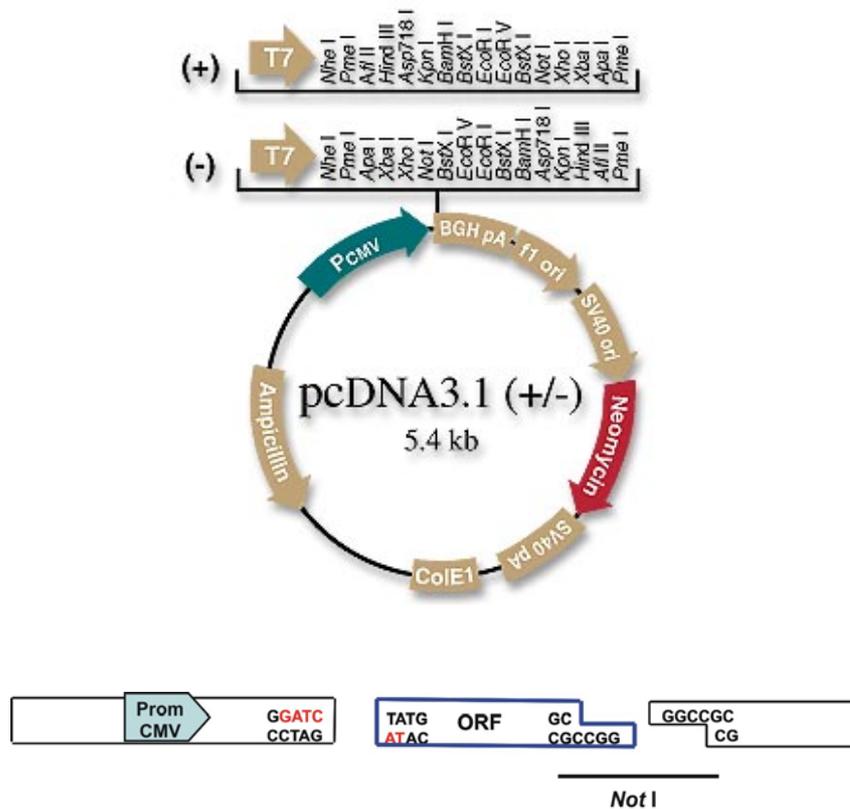
### 4.1.1 Obtenção de células MDA-MB-231 superexpressando as cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 ou CaneCPI-4

#### 4.1.1.1 Construção dos plasmídeos de expressão

As cistatinas da cana-de-açúcar foram subclonadas direcionalmente no vetor de expressão pcDNA3.1 (Invitrogen). Este vetor é utilizado para obtenção de expressão transiente ou estável em células de mamíferos. O sítio de múltipla clonagem possibilita a inserção do gene de interesse sob o controle do promotor do citomegalovírus (CMV) humano. O sinal de poliadenilação do gene que codifica o hormônio de crescimento bovino (BGH) é responsável pela terminação da transcrição e poliadenilação do mRNA. Por outro lado, o promotor e o sinal de poliadenilação do vírus SV40 permitem a expressão eficiente de um gene que confere resistência ao antibiótico neomicina (Geneticina<sup>®</sup>), o qual facilita a seleção de clones estáveis de células de mamíferos transfectadas com o vetor. Finalmente, a origem de replicação do plasmídeo pUC e o gene de resistência à ampicilina ( $\beta$ -lactamase) permitem a replicação em alto número de cópias e a seleção em *E. coli* (Figura 4.1).

Para a subclonagem das ORFs das cistatinas da cana-de-açúcar, 5  $\mu$ g do plasmídeo pcDNA3.1 foram linearizados em uma reação de clivagem de volume final de 50  $\mu$ l que continha 10 U da enzima de restrição *Bam* HI (Fermentas) e o tampão da enzima 1x [Tris-HCl 10 mM (pH 8 a 37°C), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 100 mM, Triton X-100 0,02%, BSA 0,1 mg/mL]. Após ser mantida por 2 h a 37°C, foram adicionados à reação de clivagem dNTP's em uma concentração final de 40  $\mu$ M e 1 U da enzima *Klenow* (Fermentas), para a obtenção de extremidades "cegas" (*blunt*). A reação foi então mantida por 30 min a 37°C, seguidos de 15 min a 75°C para inativação da

enzima. O DNA plasmidial foi precipitado e posteriormente clivado com 5 U da enzima de restrição *Not* I (Fermentas) em uma reação de clivagem de volume final de 40  $\mu$ L contendo o tampão da enzima 1x [Tris-HCl 50 mM (pH 7,5 a 37°C), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, BSA 0,1 mg/mL]. A reação foi mantida a 37°C por 2 h e posteriormente, submetida à eletroforese em gel de agarose para recuperação do vetor pcDNA3.1 contendo uma extremidade “cega” e a outra clivada com a enzima *Not* I, o qual foi purificado com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega).



**Figura 4.1: Esquema da construção dos plasmídeos pcDNA3.1 contendo os genes das cistatinas.** Os nucleotídeos em vermelho representam o preenchimento com a enzima *Klenow*.

Para a obtenção dos fragmentos a serem subclonados no vetor pcDNA3.1, 3  $\mu$ g das construções pET28aCaneCPI-2, pET28aCaneCPI-3 ou pET28aCaneCPI-4

foram clivados em 50  $\mu$ L finais contendo 5 U da enzima de restrição *Nde* I (Fermentas) e tampão da enzima 1x [Tris-HCl 10 mM (pH 8,5 a 37°C), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 100mM, BSA 0,1 mg/mL]. Após incubação por 2 h a 37°C, as extremidades clivadas foram preenchidas utilizando a enzima *Klenow* e posteriormente, os plasmídeos foram clivados com a enzima *Not* I, como descrito acima. Uma vez que as ORFs das cistatinas continham um códon para terminação da tradução, o sítio *Not* I do vetor pET28a pôde ser usado para a obtenção dos fragmentos com extremidades 3' coesivas ao vetor pcDNA3.1 clivado com a mesma enzima. Dessa forma, os insertos possuíam extremidades 5' *blunt* e extremidades 3' coesivas (*Not* I), facilitando a inserção das ORFs na orientação correta (**Figura 4.1**).

Os fragmentos assim obtidos também foram analisados em gel de agarose e purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega). Foram realizadas então, reações de ligação em volume final de 10  $\mu$ L contendo 100 ng do vetor pcDNA3.1 clivado, 50 ng do respectivo fragmento, 1 U da enzima ligase e tampão da enzima 1x. Estas foram mantidas a 4°C por 16 h e mais tarde utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . A seleção dos clones bacterianos contendo os plasmídeos recombinantes foi realizada por “PCR de colônia” conforme já descrito anteriormente. Os plasmídeos recombinantes foram purificados com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), seqüenciados e utilizados para transfectar as células MDA-MB-231.

#### **4.1.1.2 Transfecção das células MDA-MB-231**

A transfecção das células de câncer mamário humano da linhagem MDA-MB-231 foi realizada pelo método de lipossomos catiônicos, utilizando-se lipofectamina (*Lipofectamine* 2000 – Invitrogen). Os lipossomos catiônicos formam

complexos carregados positivamente com as moléculas de DNA polianiônicas, os quais são então introduzidos nas células através da interação com a superfície celular carregada negativamente (Spector *et al*, 1998).

Foram preparados dois tubos de 1,5 mL, A e B. No tubo A foram adicionados 20  $\mu$ L de lipofectamina e 30  $\mu$ L de meio DMEM sem soro (total: 50  $\mu$ L). O tubo B continha 30  $\mu$ L do plasmídeo recombinante ( $\sim$  10  $\mu$ g) e 20  $\mu$ L de meio DMEM sem soro (total: 50  $\mu$ L). Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente, os conteúdos destes tubos foram misturados (total: 100  $\mu$ L) e mantidos por 20 min à temperatura ambiente. Os 100  $\mu$ L foram então adicionados às células aderidas ( $\sim$  80% de confluência) em 500  $\mu$ L de meio sem soro, as quais foram incubadas por 6 h em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio foi aspirado e 2 mL de meio contendo 10% de soro foram adicionados às células, as quais foram incubadas por 48 h em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram diluídas e submetidas à seleção com 500  $\mu$ g/mL de Geneticina<sup>®</sup> (Invitrogen) durante 3 semanas até visualização das colônias de células. Clones estáveis individuais foram obtidos de colônias isoladas com o uso de *cloning rings*. As colônias individuais foram englobadas com *cloning rings* de plástico estéreis, e então, lavadas com 100  $\mu$ L de PBS. As células foram desaderidas adicionando-se 100  $\mu$ L de solução de tripsina 0,05% e transferidas para poços de uma placa de 24 poços contendo 1 mL de meio DMEM com 500  $\mu$ g/mL de Geneticina<sup>®</sup>. A partir de então, os clones estáveis selecionados foram expandidos para a utilização nos ensaios celulares. Finalmente, células MDA-MB-231 foram transfectadas com o vetor pcDNA3.1 vazio (sem a ORF das cistatinas), as quais serviram como controle negativo nos ensaios celulares.

#### 4.1.1.3 Análise da expressão das cistatinas nos clones estáveis por RT-PCR

O RNA total foi extraído dos clones selecionados utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen). A síntese dos cDNAs foi realizada utilizando-se o kit ImProm-II™ *Reverse Transcription System* (Promega). Aproximadamente 2 µg de RNA foram incubados com 0,5 µg do *primer* Oligo (dT)<sub>15</sub> por 5 min a 70°C, seguidos de mais 5 min em gelo. Adicionou-se então MgCl<sub>2</sub> (concentração final de 2,5 mM), dNTP's (concentração final de 0,5 mM), 1 µL da enzima transcriptase reversa ImProm-II™ e tampão da enzima 1x, completando um volume final de 20 µL. As reações foram mantidas por 5 min a 25°C (hibridização), 1 h a 42°C (extensão) e 15 min a 70°C (inativação da enzima). Uma alíquota de 2 µL das reações foi usada como molde em reações de amplificação de volume final de 20 µL, as quais continham os respectivos *primers* específicos (**Tabela 3.1**). A expressão do gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como controle interno. Para isso foram utilizados os primers GAPDH *forward* (5' TGAAGGTCGGAGTCA ACGGATTTGGT 3') e GAPDH *reverse* (5' CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC 3'). O protocolo de amplificação foi o mesmo que o utilizado para a obtenção dos fragmentos (item 3.1.2), e o resultado foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo sob luz UV.

#### 4.1.1.4 Análise da expressão das cistatinas nos clones estáveis por *Western blot*

Os clones de células MDA-MB-231 foram crescidos em placas de 6 poços como descrito acima até uma confluência de aproximadamente 80%. As células foram então tripsinizadas e coletadas em tubo de 1,5 mL por meio de centrifugação por 2 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram

ressuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE 1x (Tris-HCl pH 6,8 50 mM, glicerol 10%, dodecil sulfato de sódio 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.1%), sendo posteriormente lisadas por 10 minutos em água fervente para extração das proteínas. As amostras protéicas foram analisadas por SDS-PAGE e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A detecção das proteínas superexpressas pelas células foi realizada como já descrito (item 3.1.6), utilizando-se os anticorpos policlonais gerados contra as cistatinas recombinantes diluídos 1:5.000 e o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado à enzima fosfatase alcalina diluído 1:10.000. As bandas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas utilizando-se o substrato para a fosfatase alcalina. Como controle endógeno da expressão foi utilizada a proteína  $\beta$ -tubulina, a qual foi detectada com um anticorpo monoclonal anti  $\beta$ -tubulina (Calbiochem) na concentração de 5  $\mu$ g/mL.

#### **4.1.2 Medida da atividade de cisteíno catepsinas intra e extracelular das células MDA-MB-231**

Os efeitos das cistatinas da cana-de-açúcar sobre a atividade de cisteíno catepsinas intra e extracelular foram avaliados através de um ensaio fluorimétrico. As células transfectadas e não transfectadas foram incubadas por 16 h em meio sem soro, sendo posteriormente, o meio e as células processados separadamente para a determinação da atividade das catepsinas. As células aderidas foram coletadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, contendo EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton x-100 0,2%, PMSF (inibidor de serino proteases) 5  $\mu$ M, *orto*-fenantrolina (inibidor de metalo proteases) 5  $\mu$ M, e pepstatina A (inibidor de aspartil proteases) 5  $\mu$ M. Estes inibidores foram adicionados ao tampão para garantir que

somente a atividade de cisteíno proteases fosse detectada, já que o substrato utilizado no ensaio (Z-Phe-Arg-MCA) não é específico para esta classe de enzimas. As células foram então sonicadas em gelo por 60 s na potência de 20% usando o sonicador Sonic Dismembrator modelo 500 (Fisher Scientific). O lisado foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi separado. A concentração protéica dos extratos celulares foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando o reagente *Bio Rad Protein Assay* (Bio-Rad) e a proteína albumina sérica bovina como padrão. Em todos os experimentos, 50  $\mu$ L do extrato celular (~ 75  $\mu$ g de proteína total) foram adicionados a 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5 contendo DTT (dithiothreitol) 2,5 mM, e a reação foi incubada por 5 min a 37°C para ativação das cisteíno proteases. O substrato Z-Phe-Arg-MCA foi então adicionado e a atividade das catepsinas do lisado celular foi monitorada continuamente por 5 min em um espectrofluorímetro Hitachi F-2500 com comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 e 460 nm, respectivamente. As atividades residuais foram calculadas dos *slopes* das retas gerados com o programa FL Solutions 2.0 e expressas como porcentagem de atividade em relação ao controle. A atividade das catepsinas das células não transfectadas foi analisada na presença das cistatinas recombinantes ou do inibidor específico de catepsina B, CA074. Antes da adição do substrato, as cistatinas foram incubadas com o extrato celular por 5 min para permitir a interação enzima-inibidor. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As catepsinas são secretadas no meio como proenzimas inativas as quais podem ser ativadas *in vitro* através de uma proteólise limitada com pepsina. Para medir a atividade latente das cisteíno catepsinas presentes nas amostras do meio, o meio de cultura sem soro que acondicionava as células foi concentrado 20x por

filtração em uma coluna de filtração Centricon-3 (Millipore). A seguir, 100  $\mu$ L do meio concentrado foram incubados por 30 min a 37°C em tampão acetato de sódio 100 mM pH 3,5 contendo 0,5 mg/mL de pepsina (Henripharma). A reação de ativação foi bloqueada por adição de pepstatina A, a uma concentração final de 10  $\mu$ M. Depois da ativação, a atividade das catepsinas foi medida como descrito acima.

#### **4.1.3 Ensaio de proliferação celular**

Para os ensaios de proliferação celular, 200  $\mu$ L de meio de cultura DMEM (Cultilab) com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) contendo  $1 \times 10^4$  células MDA-MB-231 não transfectadas ou transfectadas com os genes das cistatinas, foram adicionados por poço em placas de 96 poços. Células transfectadas com o vetor pcDNA3.1 vazio foram utilizadas como um controle negativo da inibição. Aos poços contendo as células não transfectadas, as cistatinas recombinantes (em PBS) foram adicionadas nas seguintes concentrações: 0,02, 0,2 e 2  $\mu$ M. Neste caso, o inibidor sintético de cisteína proteases E64 foi utilizado como um controle positivo da inibição, e o PBS estéril foi adicionado como um controle negativo da inibição. Para a obtenção de uma curva padrão (absorbância vs número de células), diferentes concentrações de células foram cultivadas na mesma placa. Cada condição experimental foi realizada em triplicata. As placas foram então incubadas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24, 48 e 72 h. Após cada tempo de incubação o meio de cultura dos poços foi aspirado e estes foram lavados duas vezes com 200  $\mu$ L de PBS. As células aderidas foram coradas com cristal violeta como uma medida indireta do número de células. As células aderidas aos poços foram fixadas com 100  $\mu$ L de etanol 70% por 10 min. O etanol foi desprezado e 40  $\mu$ L de uma solução de cristal violeta 0,1%, diluída em etanol 10%, foram adicionados aos poços por mais

10 min para corar as células aderidas. Os poços foram então lavados com água destilada para retirar o excesso de corante e o pigmento retido pelas células coradas foi eluído instantaneamente por adição de 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético 10%. A absorbância foi detectada a um comprimento de onda de 540 nm em leitor de placa Dynex Revelation 3.04 (Dynex Technologies).

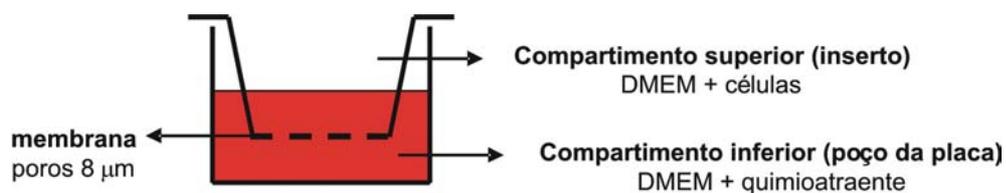
#### **4.1.4 Ensaio de adesão celular**

Para o ensaio de adesão celular, o colágeno tipo I (Sigma, cat # C9791) diluído em ácido acético 0,1% foi imobilizado por 16 h a 4°C em placa de 96 poços (1  $\mu\text{g}$  / 100  $\mu\text{L}$  / poço). Decorrido o tempo da imobilização do colágeno, foi feito o bloqueio dos poços com 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de albumina sérica bovina (BSA) 1% solubilizada em tampão de adesão pH 7,4 (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM e  $\text{MnCl}_2$  0,25 mM), por 2 h. O bloqueio é feito para garantir que a adesão das células ocorra somente à proteína imobilizada nos poços, já que sobre BSA não ocorre adesão celular. Após o bloqueio, os poços foram lavados três vezes com tampão de adesão. As células não transfectadas e transfectadas com os genes das cistatinas ou com o vetor pcDNA3.1 vazio foram tripisinizadas e lavadas três vezes em 30 mL de tampão de adesão intercaladas com centrifugações de 5 min a 2.000 rpm. Em seguida, as células (diluídas em tampão de adesão) foram adicionadas aos poços (1 x 10<sup>5</sup> células / 100  $\mu\text{L}$  / poço). Para o controle positivo da adesão celular, as células não transfectadas foram adicionadas aos poços contendo colágeno. Para o controle negativo, as células foram adicionadas a poços bloqueados com BSA, porém que não receberam o colágeno. As células contendo o vetor pcDNA3.1 vazio foram consideradas como controle negativo da inibição. As cistatinas recombinantes foram adicionadas aos poços contendo células não transfectadas nas seguintes

concentrações: 0,02, 0,2 e 2  $\mu\text{M}$ . Neste caso, para os controles positivos e negativos da inibição foram adicionados E64 e PBS, respectivamente. Concentrações conhecidas de células foram cultivadas na mesma placa para a obtenção de uma curva padrão (absorbância vs número de células). Foram preparados três poços para cada condição experimental. A placa foi mantida por 4 horas em banho-maria a 37°C e os poços foram lavados duas vezes com tampão de adesão para a remoção das células não aderidas. As células aderidas foram fixadas e coradas com cristal violeta como descrito anteriormente para o ensaio de proliferação celular. A eluição do corante também foi realizada do mesmo modo e a absorbância foi detectada em 540 nm em leitor de placa.

#### 4.1.5 Ensaio de migração celular

Para a realização do ensaio de transmigração celular foi utilizado o sistema de inserto com membrana de polietileno (PET) contendo poros de 8  $\mu\text{m}$  (BD Bioscience, cat # 353097) para cultura celular em placa de 24 poços (**Figura 4.2**).



**Figura 4.2:** Inserto utilizado nos ensaios de migração celular.

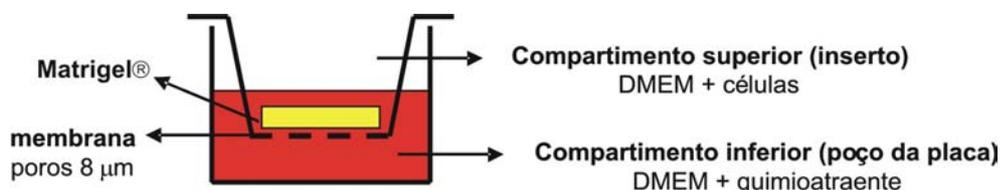
No compartimento inferior (poço de uma placa de 24 poços) foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino como quimioatraente para a migração celular. As células não transfectadas e

transfectadas, em meio DMEM sem soro, foram adicionadas no compartimento superior ( $2 \times 10^4$  células / 500  $\mu$ L / inserto). As células transfectadas com o vetor vazio foram utilizadas como um controle negativo da inibição. Para avaliar o efeito das cistatinas recombinantes, estas foram adicionadas em diferentes concentrações (0,02, 0,2 e 2  $\mu$ M) em ambos os compartimentos, inferior e superior, dos poços contendo células não transfectadas. O inibidor sintético de cisteína proteases E64 foi utilizado como um controle positivo, e o PBS como controle negativo da inibição. Três insertos foram preparados para cada condição experimental. A placa foi então incubada a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. As células que não migraram através da membrana foram removidas da parte superior desta com um cotonete. As células que migraram para o lado de baixo da membrana foram fixadas em metanol 100% por 5 min e coradas por mais 5 min em uma solução do corante azul de Toluidina 1% diluído em borato de sódio (borax) 1%. As membranas foram então lavadas em água destilada para remoção do excesso de corante, e deixadas secar ao ar. As membranas foram recortadas do inserto com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e montadas sobre uma lâmina de vidro para visualização e contagem das células ao microscópio. A migração foi calculada pela média da somatória do número de células observadas em cinco campos aleatórios, incluindo regiões centrais e periféricas, para cada inserto da triplicata. A média da contagem de células do controle negativo foi considerada como 100% de migração.

#### **4.1.6 Ensaio de invasão celular**

Para a realização destes experimentos foram utilizados os insertos com membrana de polietileno contendo poros de 8  $\mu$ m revestida com Matrigel® (BD

*BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber* - BD Bioscience, cat # 354480) para cultura celular em placa de 24 poços (**Figura 4.3**).



**Figura 4.3:** Inserto utilizado nos ensaios de invasão celular.

O ensaio de invasão em Matrigel® tornou-se um sistema amplamente utilizado para o estudo *in vitro* da habilidade invasiva de linhagens celulares, desde sua introdução na pesquisa experimental do câncer. A Matrigel®, uma lâmina basal reconstituída, é uma preparação de lâmina basal solubilizada, extraída de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongo. Ela contém colágeno tipo IV, o proteoglicano sulfato de heparan, laminina, entactina e fatores de crescimento que ocorrem naturalmente no tumor EHS. A camada de Matrigel® bloqueia a migração das células não invasivas através da membrana. Ao contrário, as células invasivas, tais como a MDA-MB-231, são capazes de degradar e invadir a Matrigel® e então, atravessar a membrana através dos poros de 8  $\mu\text{m}$ . Utilizando este ensaio é possível estudar rapidamente o efeito de substâncias, tais como inibidores de proteases, sobre o potencial invasivo de algumas linhagens de células tumorais. Sendo assim, utilizamos tal sistema para testar os efeitos das cistatinas da cana-de-açúcar na habilidade invasiva da linhagem celular de carcinoma mamário humano MDA-MB-231.

Este experimento foi realizado concomitantemente e seguindo o mesmo protocolo experimental utilizado para o ensaio de migração (item 3.1.4). A porcentagem de invasão foi obtida multiplicando-se por 100 a razão entre o número de células que invadiram e o número de células que migraram através da membrana.

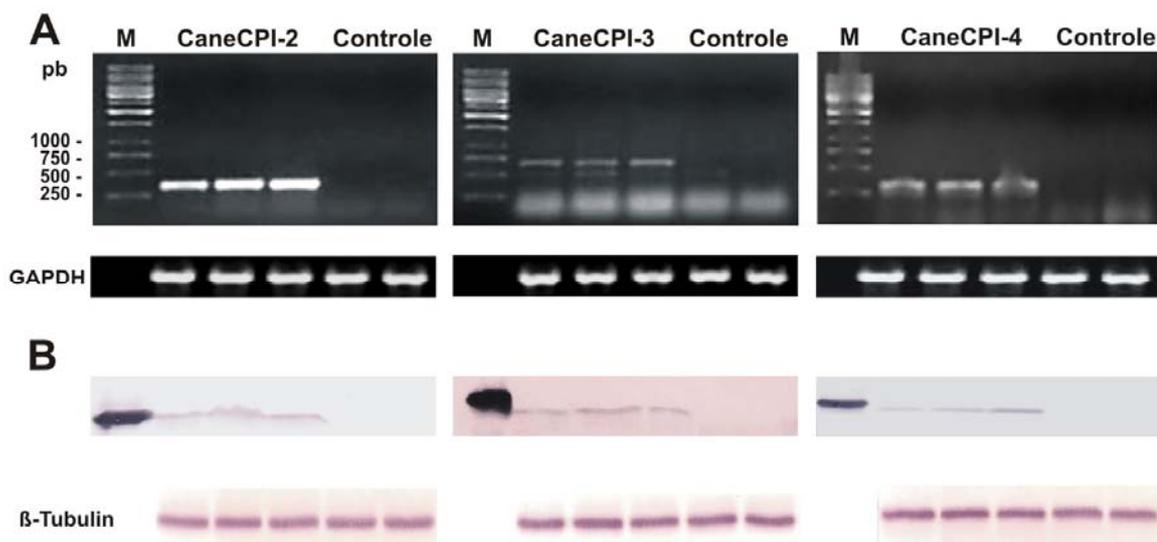
## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Caracterização dos clones estáveis expressando as cistatinas da cana-de-açúcar

Clones estáveis de células MDA-MB-231 transfectadas com os genes das cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 ou CaneCPI-4 foram isolados, e a expressão das cistatinas nas células tumorais foi detectada através das técnicas de RT-PCR e *Western blot*.

Para detectar os mRNAs das cistatinas, os cDNAs sintetizados a partir do RNA extraído dos clones foram utilizados em PCRs contendo os respectivos *primers* específicos. A análise em gel de agarose revelou a presença de bandas de tamanhos esperados referentes às ORFs das cistatinas (**Figura 4.4A**), confirmando a presença dos transcritos nos clones selecionados. Como esperado, não foram observadas bandas de amplificação nas reações contendo cDNA produzido a partir do RNA das células transfectadas com o vetor vazio (controle).

A expressão das cistatinas da cana-de-açúcar nos clones transfectados também foi determinada por *Western blot* utilizando-se os anticorpos policlonais gerados contra as cistatinas recombinantes. Como mostrado na **figura 4.4B**, bandas de proteínas de tamanhos esperados foram observadas somente nas células transfectadas com os genes das cistatinas.



**Figura 4.4: Caracterização das células MDA-MB-231 estavelmente transfectadas com os genes das cistatinas da cana-de-açúcar. (A)** Análise dos clones selecionados por RT-PCR. O cDNA sintetizado a partir do RNA das células transfectadas com os genes das cistatinas ou com o vetor pcDNA3 vazio (controle), foi utilizado em ampliações por PCR contendo os respectivos *primers* específicos. A amplificação do gene GAPDH foi utilizada como controle interno. **(B)** Análise dos clones selecionados por *Western blot*. As amostras de proteínas foram obtidas dos mesmos clones e analisadas para a presença das cistatinas utilizando os anticorpos policlonais específicos. Aliquotas das cistatinas recombinantes foram utilizadas como controle positivo. O controle endógeno da expressão foi realizado utilizando um anticorpo para  $\beta$ -tubulina.

Para os ensaios celulares, foram escolhidos, para cada cistatina, os dois clones que apresentavam maior expressão.

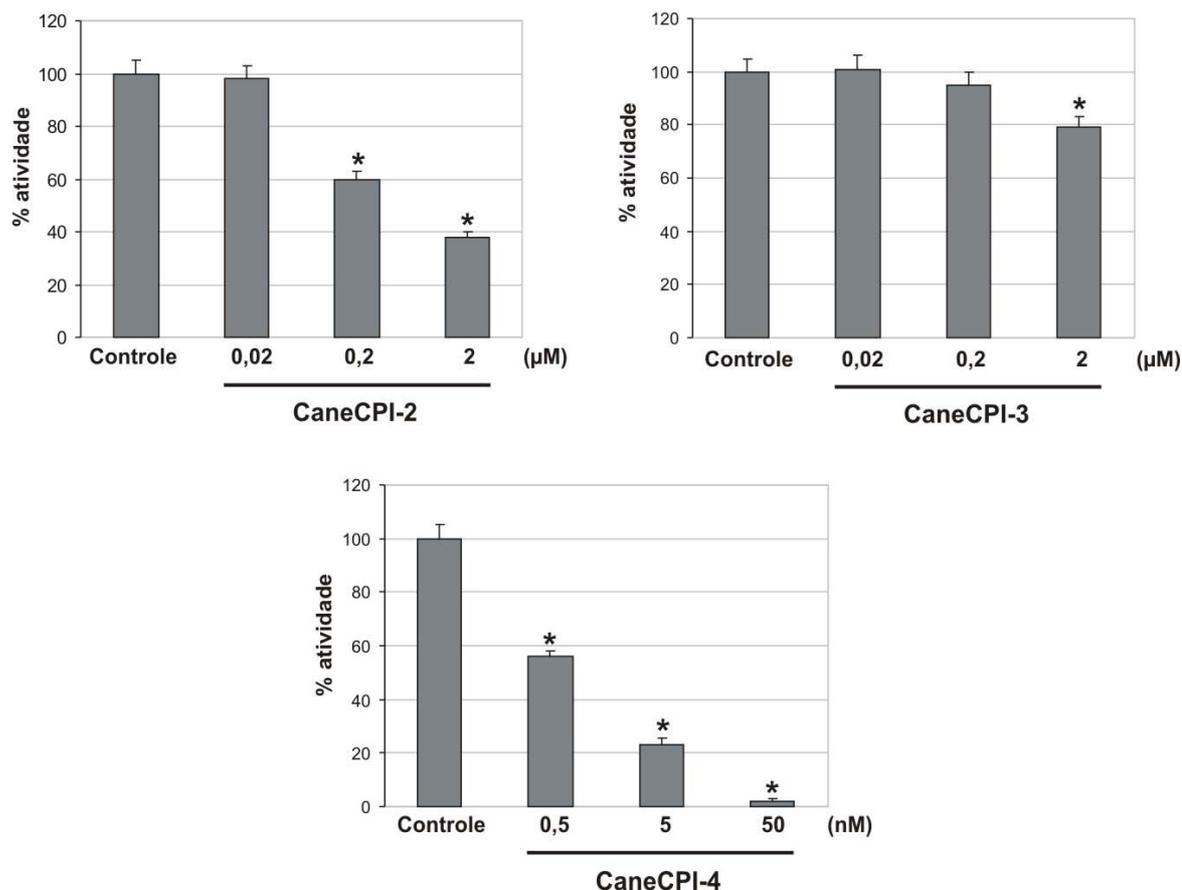
#### 4.2.2 Inibição da atividade de cisteíno catepsinas das células MDA-MB-231

Os experimentos realizados na primeira parte do trabalho avaliaram o efeito inibitório das cistatinas da cana-de-açúcar sobre a atividade das catepsinas B e L humanas recombinantes. Com o intuito de observar o efeito das cistatinas sobre a atividade das catepsinas endógenas das células MDA-MB-231, os lisados celulares e os meios de cultura que acondicionavam as células transfectadas ou não transfectadas, foram obtidos, e a atividade de cisteíno catepsinas foi medida utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA. A atividade detectada é referida como atividade de cisteíno catepsinas porque o substrato Z-Phe-Arg-MCA não é

específico para uma única enzima, podendo ser hidrolisado por várias catepsinas da classe das cisteíno proteases. No entanto, para estimar a porcentagem de atividade relativa à catepsina B nas células MDA-MB-231, foi utilizado o inibidor específico de catepsina B CA074. Os resultados mostraram que aproximadamente 70% da atividade de cisteíno catepsinas nestas células correspondeu à catepsina B, concordando com dados já relatados previamente (Zajc *et al.*, 2002; Zajc *et al.*, 2003).

Em geral, as atividades intra e extracelulares dos clones que expressavam as cistatinas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 foram similares às atividades apresentadas pelas células transfectadas com o vetor vazio (controle). Para CaneCPI-4, as atividades do lisado celular e do meio de cultura foram  $63,2 \pm 6,7\%$  e  $72,5 \pm 4,2\%$ , respectivamente, em relação ao controle, indicando uma considerável inibição das catepsinas.

O efeito da adição das cistatinas recombinantes em concentrações crescentes sobre a atividade de catepsinas nas células MDA-MB-231 também foi avaliado (**Figura 4.5**). Foi observada uma redução de aproximadamente 60% e 20% na atividade enzimática do extrato celular na presença de 2  $\mu$ M das cistatinas CaneCPI-2 e CaneCPI-3, respectivamente. A adição de 0,5 nM da cistatina CaneCPI-4 resultou em uma redução de aproximadamente 45%, e virtualmente toda a atividade de cisteíno catepsinas foi inibida na presença de 50 nM da proteína.



**Figura 4.5: Inibição da atividade de cisteíno catepsinas das células MDA-MB-231 pelas cistatinas recombinantes.** O lisado celular foi obtido como descrito em Materiais e Métodos e analisado para atividade de cisteíno catepsinas na ausência (controle) ou presença das cistatinas recombinantes em diferentes concentrações. A atividade é expressa como porcentagem em relação ao controle. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \* indica  $p < 0,05$  segundo o teste T de Student.

Por último, a atividade das catepsinas presentes no meio de cultura foi significativamente reduzida em aproximadamente 50% após a adição de CaneCPI-2 a uma concentração final de 100 nM, de CaneCPI-3 a 500 nM, ou de CaneCPI-4 a 1 nM.

### 4.2.3 Efeito das cistatinas da cana-de-açúcar na proliferação e adesão das células MDA-MB-231

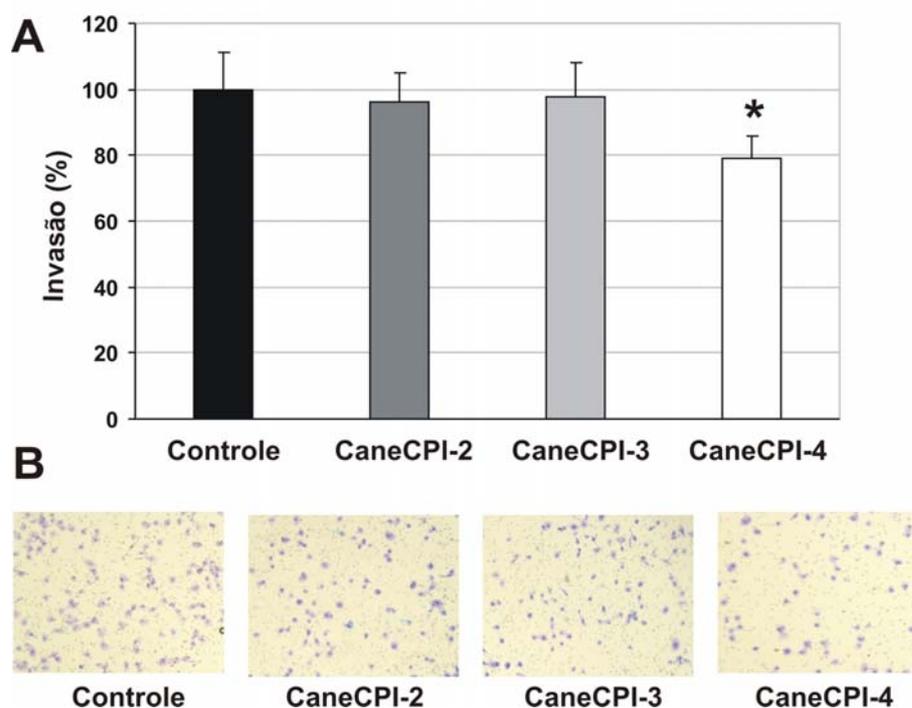
Para descartar a possibilidade de que as cistatinas da cana-de-açúcar apresentassem efeitos citotóxicos às células, ensaios de proliferação celular foram realizados com as células MDA-MB-231 na presença das cistatinas recombinantes, e com os clones que expressavam as cistatinas. A **tabela 4.1** mostra a viabilidade celular e/ou a atividade proliferativa obtida após 72 horas de incubação em relação aos controles. A influência das cistatinas na adesão das células transfectadas, assim como das cistatinas recombinantes nas células MDA-MB-231 também foi verificada (**Tabela 4.1**). Nenhuma diferença significativa nas taxas de proliferação e adesão celular foi observada, indicando que as cistatinas da cana-de-açúcar não exercem efeitos tóxicos sobre a viabilidade e adesão das células MDA-MB-231.

	PROLIFERAÇÃO		ADESÃO	
	Adição cistatina recombinante	Células transfectadas	Adição cistatina recombinante	Células transfectadas
<b>CaneCPI-2</b>	99,3 ± 4,4%	95,9 ± 5,6%	98,7 ± 3,1%	93,8 ± 5,4%
<b>CaneCPI-3</b>	101,5 ± 3%	98,1 ± 3,2%	101,7 ± 5,3%	104,1 ± 4,3%
<b>CaneCPI-4</b>	100,6 ± 5,4%	102,3 ± 4,7%	102,6 ± 2%	97,8 ± 6%

**Tabela 4.1: Efeito das cistatinas da cana-de-açúcar na proliferação e adesão das células MDA-MB-231.** Resultados obtidos nos ensaios de proliferação (após 72 h de incubação) e adesão realizados com as células MDA-MB-231 na presença de 2 µM das cistatinas recombinantes, ou com as células transfectadas. Os resultados são expressos como porcentagem em relação aos controles (PBS, no caso da adição das cistatinas, ou células transfectadas com o vetor pcDNA3 vazio, no caso das células transfectadas). Os valores representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes.

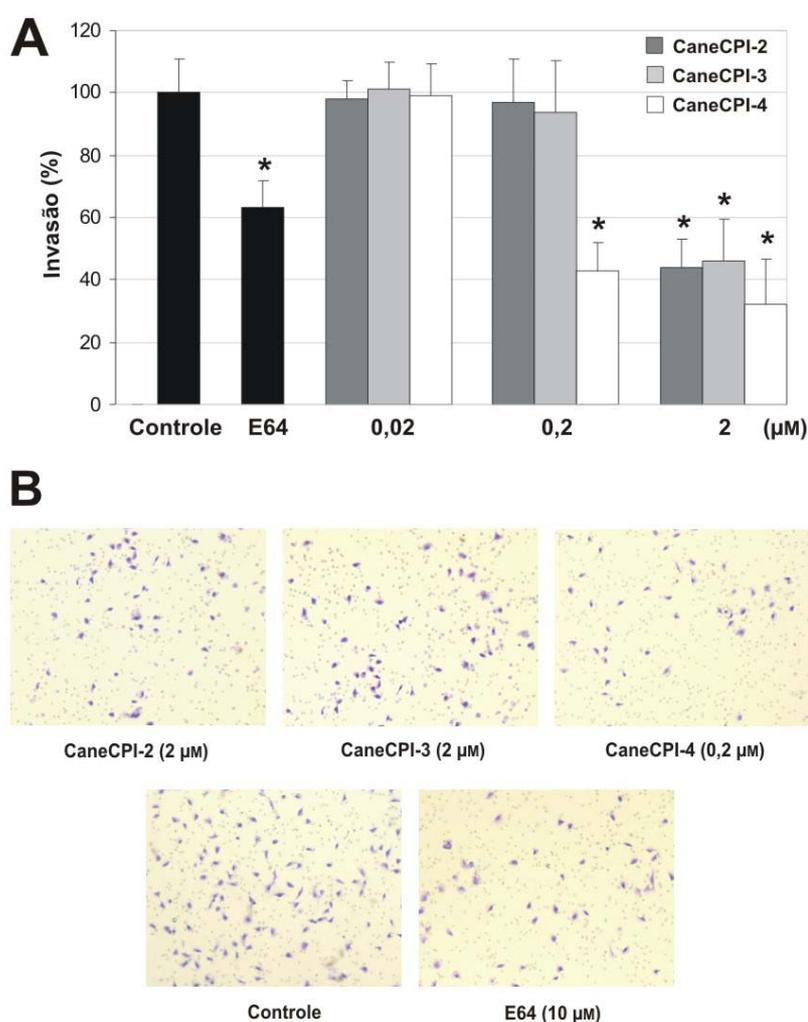
#### 4.2.4 Efeito das cistatinas da cana-de-açúcar na migração e invasão das células MDA-MB-231

Os ensaios fluorimétricos realizados com os clones transfectados mostraram que a expressão da cistatina CaneCPI-4 levava a uma redução na atividade das catepsinas endógenas. Para determinar se essa redução poderia estar associada a uma diminuição nas taxas de migração e/ou invasão celulares, os clones que expressavam as cistatinas foram analisados. Como esperado, as células que expressavam as cistatinas CaneCPI-2 ou CaneCPI-3 não mostraram nenhuma diferença significativa nas taxas de migração e invasão em relação ao controle. No entanto, a invasão das células que expressavam CaneCPI-4 foi reduzida em 20%, não sendo observadas diferenças quanto à migração (Figura 4.6).



**Figura 4.6: Invasão das células MDA-MB-231 transfectadas com os genes das cistatinas da cana-de-açúcar.** Os clones transfectados com o vetor vazio (controle) e aqueles que expressavam as cistatinas CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 foram analisados em ensaio de invasão em Matrigel®. (A) A invasão é expressa como porcentagem em relação às células controle. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \* indica  $p < 0,05$  segundo o teste T de Student. (B) Imagens ao microscópio (50X) representativas das membranas dos insertos utilizados no ensaio. As células coradas com azul de Toluidina podem ser facilmente distinguidas dos poros de 8  $\mu\text{m}$ .

Quando as cistatinas recombinantes foram adicionadas às membranas juntamente com as células MDA-MB-231, a habilidade invasiva das células foi significativamente reduzida em aproximadamente 60% com 0,2  $\mu\text{M}$  de CaneCPI-4 ou 2  $\mu\text{M}$  de CaneCPI-2 ou CaneCPI-3 (**Figura 4.7**).



**Figura 4.7: Efeito das cistatinas da cana-de-açúcar recombinantes sobre a habilidade invasiva das células MDA-MB-231.** (A) Os ensaios de invasão em Matrigel<sup>®</sup> foram realizados com as células MDA-MB-231 na ausência (controle) ou presença de E64 (10  $\mu\text{M}$ ) ou das cistatinas recombinantes nas concentrações indicadas. A invasão é expressa como porcentagem em relação ao controle (PBS). Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \* indica  $p < 0,05$  segundo o teste T de Student. (B) Imagens ao microscópio (50X) representativas das membranas dos insertos utilizados no ensaio. As células coradas com azul de Toluidina podem ser facilmente distinguidas dos poros de 8  $\mu\text{m}$ .

Por último, em relação à migração das células MDA-MB-231 na presença das cistatinas recombinantes, houve uma redução de aproximadamente 40% com 0,2  $\mu$ M de CaneCPI-4 ou 2  $\mu$ M de CaneCPI-2 ou CaneCPI-3, quando comparado ao controle.

### 4.3 DISCUSSÃO

O alto índice de mortalidade entre os pacientes com câncer está associado ao estabelecimento de metástases pelo organismo. As etapas chave no processo de metástase, a degradação e invasão da matriz extracelular e lâmina basal pela célula tumoral, envolvem a ação de enzimas proteolíticas. Além de serino e metaloproteases, cujo envolvimento na progressão do câncer está bem caracterizado, recentemente tem sido relatada uma importante associação de cisteíno proteases, principalmente as catepsinas B e L, com o processo de invasão de células tumorais. Neste sentido, inibidores específicos de cisteíno proteases, as cistatinas, têm sido utilizados na tentativa de atenuar a habilidade invasiva de linhagens celulares tumorais. Shridhar e colaboradores, por exemplo, demonstraram que a cistatina M humana era capaz de reduzir a invasão *in vitro* de uma linhagem celular de câncer mamário humano (Shridhar *et al*, 2004).

Uma vez obtidas as cistatinas da cana-de-açúcar recombinantes puras, o efeito destas sobre a habilidade invasiva da linhagem celular de câncer mamário humano MDA-MB-231 foi avaliado. Paralelamente, o efeito das cistatinas também foi analisado utilizando-se clones celulares MDA-MB-231 que expressavam as cistatinas da cana-de-açúcar. Os resultados obtidos indicam que os diferentes valores de  $K_i$  encontrados contra as catepsinas B e L correlacionam-se com a capacidade das cistatinas de inibir a atividade de cisteíno catepsinas das células, assim como, a invasão celular através de uma matriz de Matrigel®.

Ao contrário das células transfectadas com as cistatinas CaneCPI-2 ou CaneCPI-3, as células que expressavam a cistatina CaneCPI-4 apresentaram uma redução na atividade de cisteíno catepsinas. Utilizando um inibidor seletivo, foi confirmado que uma grande porcentagem (~70%) da atividade de cisteíno

catepsinas nas células MDA-MB-231 corresponde à catepsina B, conforme já relatado anteriormente (Zajc *et al*, 2002; Zajc *et al*, 2003). Desta forma, as diferenças nos valores de  $K_i$  contra a catepsina B poderiam explicar os resultados observados. Entretanto, a inibição da atividade de cisteíno catepsinas nos lisados celulares e nos meios de cultura das células transfectadas não foi tão substancial quanto àquela observada com a adição das cistatinas recombinantes, provavelmente devido aos baixos níveis de expressão das cistatinas da cana-de-açúcar detectados nos clones.

Na tentativa de explicar a menor atividade extracelular de cisteíno catepsinas apresentada pelos clones que expressavam a CaneCPI-4, foi realizado um *Western blot* com o extrato celular e o meio de cultura das células transfectadas (resultados não mostrados). Entretanto, a cistatina não foi detectada no meio de cultura que acondicionava as células. Embora a ausência de um peptídeo sinal não possibilite a secreção da proteína, alterações no sistema de endereçamento de proteínas, características de células tumorais, poderiam resultar na secreção da CaneCPI-4. Considerando sua alta atividade inibitória contra ambas as catepsinas, mínimas quantidades de CaneCPI-4 extracelular, não detectáveis por *Western blot*, poderiam estar presentes no meio de cultura dos clones transfectados. Isso poderia explicar a redução da atividade de cisteíno catepsinas extracelular e também a pequena inibição observada no ensaio de invasão.

As catepsinas contribuem para a invasão celular diretamente por meio da degradação da matriz extracelular e lâmina basal, e indiretamente por meio da ativação de outras enzimas da cascata proteolítica, tais como metalo proteases de matriz e o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), levando em última instância à degradação da matriz extracelular (Gocheva e Joyce, 2007). Dentre os membros da família das catepsinas, as catepsinas B and L têm sido mais

extensivamente associadas à progressão de tumores (Gocheva and Joyce, 2007). Os clones que expressavam a CaneCPI-4 mostraram uma pequena redução na invasão através da Matrigel<sup>®</sup>. Uma inibição mais significativa da invasão celular foi observada na presença de 0,2  $\mu$ M da cistatina CaneCPI-4 recombinante, ou 2  $\mu$ M das cistatinas CaneCPI-2 ou CaneCPI-3. Já a adição de CaneCPI-4 a uma concentração de 2  $\mu$ M não levou à completa inibição da invasão, indicando que outras proteases, tais como serino e metalo proteases, participam na degradação da matriz de Matrigel<sup>®</sup>. Comparando estes resultados e, novamente considerando os valores de  $K_i$  contra a catepsina B, podemos concluir que a concentração das proteínas CaneCPI-2 e CaneCPI-3 nos clones transfectados não seria suficiente para inibir eficientemente a atividade das catepsinas e dessa forma reduzir a invasão. Embora a proteína CaneCPI-4 tenha apresentado um nível de expressão comparável ao das outras cistatinas, o seu maior poder inibitório, principalmente contra a catepsina B, poderia explicar a redução de 20% na invasão das células MDA-MB-231 transfectadas. Por último, estes resultados concordam com os dados obtidos nos ensaios fluorimétricos, e ainda destacam a importância das catepsinas no processo invasivo, como relatado anteriormente (Joyce e Hanahan, 2004; Jedeszko e Sloane, 2004; Joyce *et al*, 2004).

Embora as catepsinas atuem principalmente intracelularmente dentro de lisossomos, o alto nível de expressão da catepsina B em células tumorais leva a um transporte intracelular alterado da enzima, resultando na secreção aumentada e na localização alterada da catepsina. Assim, a catepsina B passa a ser localizada em vesículas periféricas e/ou associadas com a membrana plasmática (Roshy *et al*, 2003; Sloane *et al*, 1994; Mohamed and Sloane, 2006). Além da degradação extracelular das proteínas da matriz, as células tumorais podem adquirir os

componentes da matriz extracelular por fagocitose e degradá-los intracelularmente, facilitando a invasão da célula tumoral (Coopman *et al*, 1998). Sameni e colaboradores demonstraram que em células de câncer mamário humano a catepsina B pode degradar as proteínas da matriz extracelular intracelularmente nos lisossomos, e ainda, que esta degradação é inibida por cistatina C, a qual pode ser fagocitada alcançando o compartimento lisossomal (Sameni *et al*, 2000). Entretanto, análises por meio de *Western blot* e imunofluorescência realizadas após a incubação das células MDA-MB-231 com as cistatinas recombinantes, não detectaram as cistatinas dentro das células (resultados não mostrados). Desta forma, os resultados indicam que as cistatinas não estão sendo internalizadas por endocitose e que, portanto, a redução da degradação da matriz extracelular, e consequentemente da invasão celular, ocorre principalmente por meio da inibição das catepsinas secretadas.

Em relação ao uso das cistatinas da cana-de-açúcar, principalmente a CaneCPI-4, como possíveis agentes terapêuticos contra a progressão do câncer, seria necessário avaliar a seletividade e a metodologia a ser usada para a administração da proteína terapêutica ao sítio de ação. O bloqueio da atividade de catepsina pela administração de inibidores protéicos de amplo espectro pode causar efeitos colaterais indesejáveis. Diferentes tipos de tumor são caracterizados por diferentes perfis de proteases, os quais variam segundo o estágio de desenvolvimento tumoral. Mesmo sendo endereçadas apropriadamente ao tumor, as cistatinas tenderiam a inibir outras catepsinas. Desta forma, a especificidade das cistatinas frente às diferentes catepsinas deveria ser estimada com precisão antes de serem consideradas para fins terapêuticos. Finalmente, uma vez que o efeito anti-invasivo das cistatinas é exercido principalmente por meio da inibição da

atividade das catepsinas extracelulares, a fusão das cistatinas com moléculas que facilitam sua internalização, a princípio, não seria necessário. Ainda, considerando o fato de que nas células normais a maioria das catepsinas atua intracelularmente em lisossomos, e já que as cistatinas da cana-de-açúcar não são internalizadas, a utilização destas proteínas como agentes terapêuticos torna-se vantajosa devido à diminuição dos efeitos colaterais.

## 5 CONCLUSÕES

- As cistatinas da cana-de-acúcar recombinantes CaneCPI-2, CaneCPI-3 e CaneCPI-4 foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade.
- As cistatinas puras mostraram-se estáveis, mantendo suas atividades inibitórias por três meses quando armazenadas a uma temperatura igual ou menor do que 4°C.
- As três cistatinas recombinantes apresentaram atividade inibitória *in vitro* contra a catepsina L humana, enquanto somente a CaneCPI-4 foi capaz de inibir eficientemente a atividade da catepsina B humana.
- O estudo da atividade inibitória da CaneCPI-4 contra a catepsina B por meio da construção de formas mutantes das cistatinas, indicaram que a inibição poderia ocorrer por um mecanismo de dois passos.
- Os diferentes valores de  $K_i$  correlacionaram-se com a capacidade das cistatinas de inibir a atividade de cisteíno catepsinas das células MDA-MB-231, assim como, a invasão celular através de uma matriz de Matrigel<sup>®</sup>.
- Os resultados obtidos abrem a possibilidade de utilização destes inibidores na inibição da invasão de outras linhagens de células tumorais, ou mesmo em estudos *in vivo* de inibição da invasão celular e metástase tumoral.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUSUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (Oryzacystatin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 35, 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. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 933-937, 1992.

ABRAHAMSON, M. Cystatins – Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Association of the Advancement of Science**, v. 45, n. 5, p. 299-304, 1993.

ABRAHAMSON, M. Cystatins. **Methods Enzymology**, v. 244, p. 685-700, 1994.

ABRAHAMSON, M.; MASON, R. W.; HANSSON, H.; BUTTLE, D.; 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. **Biochemical Journal**, v. 273, p. 621-626, 1991.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

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, n. 22, p. 6612-6617, 2002.

AUERSWALD, E. A.; GENENGER, G.; ASSFALG-MACHLEIDT, I.; MACHLEIDT, W.; ENGH, R. A.; FRITZ, H. Recombinant chicken egg white cystatin variants of the QLVSG region. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, n. 3, p. 837-845, 1992.

BARRETT, A. J.; FRITZ, H.; GRUBB, A.; ISEMURA, S.; JÄRVINEN, M.; KATUNUMA, N.; MACHLEIDT, W.; MÜLLER-ESTERL, W.; SASAKI, M.; TURK, V. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. **Biochemical Journal**, v. 236, p. 312, 1986a.

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.; Salvesen, G. eds., Elsevier Science Publisher, 1986b. p. 515-569.

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

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. **Methods in enzymology**, v. 244, p. 1-15, 1994.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. Handbook of Proteolytic Enzymes. 2. ed. Elsevier Academic Press, 2004.

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. Proteolytic Enzymes: A practical approach. England: Oxford University Press, 1989.

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. **Biochemical Journal**, v. 299, p. 219-225, 1994.

BODE, W.; ENGH, R.; MUSIL, D.; THIELE, U.; HUBER, R.; KARSHIKOV, A.; BRZIN, J.; KOS, J.; TURK, V. The 2.0 Å X ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 8, p. 2593-2599, 1988.

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

CEZARI, M. H.; PUZER, L.; JULIANO, M. A.; CARMONA, A. K.; JULIANO, L. Cathepsin B carboxydipeptidase specificity analysis using internally quenched fluorescent peptides. **Biochemical Journal**, v. 368, p. 365-369, 2002.

COLELLA, R.; CASEY, S. F. Decreased activity of cathepsin L + B and decreased invasive ability of PC3 prostate cancer cells. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 78, n. 2, p. 101-108, 2003.

COLELLA, R.; JACKSON, T.; GOODWYN, E. Matrigel® invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L + B activity. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 79, n. 3-4, p. 121-127, 2004.

COOPMAN, P. J.; DO, M. T.; THOMPSON, E. W.; MUELLER, S. C. Phagocytosis of cross-linked gelatin matrix by human breast carcinoma cells correlates with their invasive capacity. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 2, p. 507-515, 1998.

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

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

COTRIN, S. S.; PUZER, L.; DE SOUZA JUDICE, W. A.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K.; JULIANO, M. A. Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B. **Analytical Biochemistry**, v. 335, n. 2, p. 244-252, 2004.

COULOMBE, R.; GROCHULSKI, P.; SIVARAMAN, J.; MÉNARD, R.; MORT, J. S.; CYGLER, M. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 20, p. 5492-5503, 1996.

DICKINSON, D. P. Cysteine Peptidases of Mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in healthy and disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 238-275, 2002.

ERVIN, H.; COX, J. L. Late stage inhibition of hematogenous melanoma metastasis by cystatin C over-expression. **Cancer Cell International**, v. 5, n. 1, p. 14, 2005.

FUJINAGA, M.; CHERNEY, M. M.; OYAMA, H.; ODA, K.; JAMES, M. N. G. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3364-3369, 2004.

FUJISHIMA A.; IMAI, Y.; NOMURA, T.; FUJISAWA, Y.; YAMAMOTO, Y.; SUGAWARA, T. The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. **FEBS Letters**, v. 407, n. 1, p. 47-50, 1997.

GOCHEVA, V.; JOYCE, J. A. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. **Cell Cycle**, v. 6, n. 1, p. 60-64, 2007.

GOUET, P.; COURCELLE, E.; STUART, D. I.; METOZ, F. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305-308, 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, n. 12, p. 4071-4079, 1998.

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

ILLY, C.; QURAIISHI, O.; WANG, J.; PURISIMA, E.; VERNET, T.; MORT, J. S. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1197-1202, 1997.

JEDESZKO, C.; SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins in human cancer. **Biological Chemistry**, v. 385, n. 11, p. 1017-1027, 2004.

JOSHI, B. N.; SAINANI, M. N.; BASTAWADE, K. B.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, n. 2, p. 382-387, 1998.

JOYCE, J. A.; HANAHAN, D. Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. **Cell Cycle**, v. 3, n. 12, p. 1516-1519, 2004.

JOYCE, J. A.; BARUCH, A.; CHEHADE, K.; MEYER-MORSE, N.; GIRAUDO, E.; TSAI, F. Y.; GREENBAUM, D. C.; HAGER, J. H.; BOGYO, M.; HANAHAN, D. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 5, n. 5, p. 443-453, 2004.

KEPPLER, D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. **Cancer Letters**, v. 235, n. 2, p. 159-176, 2006.

KNIGHT, C. G. The characterization of enzyme inhibition. In: Proteinase Inhibitors. Amsterdam: Barrett A. J.; Salvesen, G. eds., Elsevier Science Publisher, 1986. p. 23-51.

KOLKHORST, V.; STÜRZEBECKER, J.; WIEDERANDERS, B. Inhibition of tumor cell invasion by protease inhibitors: correlation with the protease profile. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 124, n. 11, p. 598-606, 1998.

KONDO, H.; ABE, K.; NISHIMURA, I.; WATANABE, H.; EMORI, Y.; ARAI, S. Two distinct species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 26, p. 15832-15837, 1990.

KRUEGER, S.; HAECKEL, C.; BUEHLING, F.; ROESSNER, A. Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. **Cancer Research**, v. 59, n. 23, p. 6010-6014, 1999.

KRUEGER, S.; KELLNER, U.; BUEHLING, F.; ROESSNER, A. Cathepsin L antisense oligonucleotides in a human osteosarcoma cell line: effects on the invasive phenotype. **Cancer Gene Therapy**, v. 8, n. 7, p. 522-528, 2001.

KRUPA, J. C.; HASNAIN, S.; NÄGLER, D. K.; MÉNARD, R.; MORT, J. S. S2' substrate specificity and the role of His110 and His111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. **Biochemical Journal**, v. 361, p. 613-619, 2002.

KURODA, M.; KIYOSAKI, T.; MATSUMOTO, I.; MISAKA, T.; ARAI, S.; ABE, K. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 22-28, 2001.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEATHERBARROW, R. J. Grafit Version 3.0, Erithacus Software Ltd., Staines, UK, 1992.

LEUNG-TOUNG; LI, W.; TAM, T. F.; KARIMIAN, K. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 979-1002, 2002.

LI, W.; DING, F.; ZHANG, L.; LIU, Z.; WU, YU.; LUO, A.; WU, M.; WANG, M.; ZHAN, Q.; LIU, Z. Overexpression of stefin A in human esophageal squamous cell carcinoma cells inhibits tumor cell growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 24, p. 8753-8762, 2005.

LUO, A.; KONG, J.; HU, G.; CHOONG-CHIN, L.; XIONG, M.; WANG, X.; JI, J.; WANG, T.; ZHI, H.; WU, M.; LIU, Z. Discovery of Ca<sup>2+</sup>-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. **Oncogene**, v. 23, n. 6, p. 1291-1299, 2004.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and Phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 359, n. 1, p. 24-30, 1998.

MARTINEZ, M.; ABRAHAM, Z.; GAMBARDELLA, M.; ECHAIDE, M.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1821-1829, 2005.

MARTINEZ, M.; DIAZ-MENDOZA, M.; CARRILLO, L.; DIAZ, I. Carboxy terminal extended phytocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 581, n. 16, p. 2914-2918, 2007.

McGRATH, M. E. The lysosomal cysteine proteases. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, v. 28, p. 181-204, 1999.

McGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, p. 404-405, 2000.

MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 764-775, 2006.

MUSIL, D.; ZUCIC, D.; ENGH, R. A.; MAYR, I.; HUBER, R.; POPOVIC, T.; TURK, V.; TOWATARI, T.; KATUNUMA, N.; BODE, W. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 9, p. 2321-2330, 1991.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 34-36, 1999.

NIELSEN, H.; KROGH, A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. California: AAAI Press, 1998.

NOGAROTO, V.; TAGLIAVINI, S. A.; GIANOTTI, A.; MIKAWA, A.; BARROS, N. M. T.; PUZER, L.; CARMONA, A. K.; COSTA, P. I.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a nonpathogenic strain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 261, p. 187-193, 2006.

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 Letters**, v. 422, n. 1, p. 61-64, 1998.

OHTSUBO, S.; KOBAYASHI, H.; NORO, W.; TANIGUSHI, M.; SAYITO, E. Molecular cloning and characterization of Oryzacystatin-III, a novel member of phytocystatins in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5218-5224, 2005.

OLIVA, M. L. V.; CARMONA, A. K.; ANDRADE, S. S.; COTRIN, S. S.; SOARES-COSTA, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine protease inhibitor from sugarcane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 4, p. 1082-1086, 2004.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases and Cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91-104, 2003.

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 proteases as pharmacological targets in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 22-28, 2007.

PAVLOVA, A.; KRUPA, J. C.; MORT, J. S.; ABRAHAMSON, M.; BJÖRK, I. Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration by release of loop anchoring through mutation of His110. **FEBS Letters**, v. 487, n. 2, p. 156-160, 2000.

PERNAS, M.; SANCHEZ-MONGE, R.; GOMES, L.; SALCEDO, G. A chestnut seed cystatin differentially effects against cysteine proteinases from closely related pests. **Plant Molecular Biology**, v. 38, n. 6, p. 1235-1242, 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of cysteine proteases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 461-486, 1994.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, D270-D272, 2006.

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

ROSHY, S.; SLOANE, B. F.; MOIN, K. Pericellular cathepsin B and malignant progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 22, n. 2-3, p. 271-286, 2003.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.

SALEH, Y.; SIEWINSKI, M.; KIELAN, W.; ZIOLKOWSKI, P.; GRYBOS, M.; RYBKA, J. Regulation of cathepsin B and L expression in vitro in gastric cancer tissues by egg cystatin. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 3, n. 6, p. 319-324, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMENI, M.; MOIN, K.; SLOANE, B. F. Imaging proteolysis by living human breast cancer cells. **Neoplasia**, v. 2, n. 6, p. 496-504, 2000.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, p. 157-162, 1967.

SHRIDHAR, R.; ZHANG, J.; SONG, J.; BOOTH, B. A.; KEVIL, C. G.; SOTIROPOULOU, G.; SLOANE, B. F.; KEPLER, D. Cystatin M suppresses the malignant phenotype of human MDA-MB-435S cells. **Oncogene**, v. 23, n. 12, p. 2206-2215, 2004.

SHYU, D. J. H.; CHOU, W. M.; YIU, T. J.; LIN, C. P. C.; TZEN, J. T. C. Cloning, functional expression, and characterization of cystatin in sesame seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1350-1356, 2004.

SIMS, A. H.; DUNN-COLEMAN, N. S.; ROBSON, G. D.; OLIVER, S. G. Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 1, p. 95-101, 2004.

SKRZYDLEWSKA, E.; SULKOWSKA, M.; KODA, M.; SULKOWSKI, S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 9, p. 1251-1266, 2005.

SLOANE, B. F.; MOIN, K.; SAMENI, M.; TAIT, L. R.; ROZHIN, J.; ZIEGLER, G. Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 373-384, 1994.

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, n. 5, p. 1194-1199, 2002.

SPECTOR, D. L.; GOLDMAN, R. D.; LEINWAND, L. A. Cells, A Laboratory Manual. Volume 2: Light Microscopy and Cell Structure. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

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

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 285, p. 213-219, 1991.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, n. 1-2, 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, n. 11, p.1305-1309, 2004.

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

VETTORE, A. L.; DA SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; DA SILVA, A. M.; FERRO, M. I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E. A.; LEMOS, M. V.; COUTINHO, L. L.; NOBREGA, M. P.; CARRER, H.; FRANÇA, S. C.; BACCI JÚNIOR, M.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; NUNES, L. R.; CAMARGO, L. E.; SIQUEIRA, W. J.; VAN SLUYS, M. A.; THIEMANN, O. H.; KURAMAE, E. E.; SANTELLI, R. V.; MARINO, C. L.; TARGON, M.; FERRO, J. A.; SILVEIRA, H. C.; MARINI, D. C.; LEMOS, E. G.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; TAMBOR, J. H.; CARRARO, D. M.; ROBERTO, P. G.; MARTINS, V. G.; GOLDMAN, G. H.; DE OLIVEIRA, R. C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C. A.; ROSSI, M.; DE ARAUJO, P. G.; SCULACCIO, S. A.; ANGELLA, A.; LIMA, M. M.; DE ROSA JÚNIOR, V. E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V. E.; MACHADO, M. A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S. M.; NOBREGA, F. G.; MENCK, C. F.; BRAGA, M. D.; TELLES, G. P.; CARA, F. A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v. 13, n. 12, pp. 2725-2735, 2003.

VIGNESWARAN, N.; WU, J.; NAGARAJ, N.; JAMES, R.; ZEEUWEN, P.; ZACHARIAS, W. Silencing of cystatin M in metastatic oral cancer cell line MDA-686Ln by siRNA increases cysteine proteinases and legumain activities, cell proliferation and in vitro invasion. **Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 898-907, 2006.

WANG, K. K. W.; YUEN, P. W.; Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potentials. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 412-419, 1994.

WICKRAMASINGHE, N. S.; NAGARAJ, N. S.; VIGNESWARAN, N.; ZACHARIAS, W. Cathepsin B promotes both motility and invasiveness of oral carcinoma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 436, n. 1, p. 187-195, 2005.

WIEDERANDERS, B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 3, p. 691-713, 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, n. 4, p. 493-501, 2005.

YANG, Z.; COX, J. L. Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma. **Cancer Cell International**, v. 7, p. 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 Letters**, v. 187, p. 185-190, 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, n. 4, p. 233-240, 2003.

ZHANG, J.; SHRIDHAR, R.; DAI, Q.; SONG, J.; BARLOW, S. C.; YIN, L.; SLOANE, B. F.; MILLER, F. R.; MESCHONAT, C.; LI, B. D. L.; ABREO, F.; KEPPLER, D. Cystatin M: A novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 19, p. 6957-6964, 2004.