

Caracterização físico-química da isoforma γ -tripsina bovina

Caroline Dutra Lacerda

**Dissertação de mestrado em Bioquímica e
Farmacologia**

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Junho de 2014

Caracterização físico-química da isoforma γ -tripsina bovina

Caroline Dutra Lacerda

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 26/06/2014 por:

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos - Orientador, UFES

Prof. Dr. Marcos Aurélio de Santana, UFOP

Prof. Dr. Joselito Nardy Ribeiro, UFES

Prof. Dra. Rita Gomes Wanderley Pires, UFES

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Junho de 2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

L131c Lacerda, Caroline Dutra, 1990-
Caracterização físico-química da isoforma γ -tripsina bovina /
Caroline Dutra Lacerda. – 2014.
89 f. : il.

Orientador: Alexandre Martins Costa Santos.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Isoformas de Proteínas. 2. Físico-química. 3. Ativação
Enzimática. 4. Tripsina. I. Santos, Alexandre Martins Costa. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me conceder o dom da vida, me amparar nos momentos difíceis e me dar força interior para superar as dificuldades.

A toda minha família a qual amo muito, especialmente aos meus pais **Alba Valéria Dutra de Almeida** e **Sidinê Dutra de Lacerda**, minhas avós **Nilza Cunha Lacerda** e **Alaíde Dutra de Almeida** e minha irmã **Priscila Dutra Lacerda** e ao meu namorado **Luiz Gustavo André Oliveira** que sempre me incentivaram e me deram muito apoio nessa jornada.

Ao Professor Dr. **Alexandre Martins Costa Santos**, que me orientou na realização deste trabalho. Agradeço o apoio, a partilha do conhecimento e as valiosas contribuições para o trabalho, além da liberdade e confiança dispensada a mim para o desenvolvimento deste projeto e contribuição para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Professor Dr. **Valdenir José Belinelo** (*in memoriam*), que foi meu primeiro orientador de iniciação científica, me oferecendo a oportunidade de conhecer o mundo da pesquisa científica, além de seus conselhos e direcionamentos sobre minha vida acadêmica.

Ao Professor Dr. **Marcelo Antônio Oliveira**, que foi meu orientador de iniciação científica e TCC, que me ensinou muito sobre química analítica e instrumental, conhecimentos muito importante para desenvolver esse trabalho.

Aos alunos de iniciação científica **Silvana Fontoura** e **Antônio Victor Vasconcelos** por sua grande contribuição em todo este trabalho científico.

Ao **Jamil Silvano** técnico do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas da UFMG por toda colaboração para a realização deste trabalho.

A **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço imensamente a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a concretização desta dissertação e me estimularam intelectual e emocionalmente.

A todos meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Serino proteases	16
1.1.1	Características das serino proteases.....	16
1.1.2	Estrutura primária do tripsinogênio e das isoformas de tripsina.	18
1.1.3	Ativação do tripsinogênio e formação das isoformas de tripsina.	19
1.1.4	Estruturas secundária e terciária	23
1.2	Termodinâmica de proteínas	26
1.3	Aplicações da tripsina.....	29
1.3.1	Aplicação farmacêutica.....	29
1.3.2	Aplicação industrial.....	30
1.3.3	Aplicação bioquímica.....	31
2	JUSTIFICATIVA.....	32
3	HIPÓTESE DA DISSERTAÇÃO	33
4	OBJETIVO GERAL.....	34
4.1	Objetivos Específicos	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	Purificação das isoformas de tripsina.....	35
5.1.1	Determinação da massa molecular das isoformas de tripsina e pureza da γ -tripsina por espectrometria de massa	35
5.2	Análise estrutural da origem das isoformas γ - e α -tripsina	36
5.3	Caracterização da atividade enzimática das isoformas γ - e α -tripsina.....	36
5.3.1	Avaliação da atividade enzimática amidásica e esterásica em função do pH das isoformas γ - e α -tripsina.	37
5.3.2	Avaliação da atividade enzimática amidásica e esterásica em função da adição de Cloreto de Cálcio das isoformas γ - e α -tripsina.	38
5.3.3	Avaliação da atividade amidásica em função da adição de Cloreto de sódio das isoformas γ - e α -tripsina.....	38
5.3.4	Perfil de estabilidade térmica em função do tempo e temperatura das isoformas γ - e α -tripsina.....	39
5.4	Determinação do volume hidrodinâmico das isoformas γ - e α -tripsina.....	40
5.4.1	Cromatografia de exclusão molecular das isoformas γ - e α -tripsina.....	40
5.4.2	Espalhamento dinâmico de luz das isoformas γ - e α -tripsina.	40
5.5	Determinação do potencial zeta e carga superficial das isoformas γ - e α -tripsina ..	41
5.6	Estudo da desnaturação térmica monitorada por espectroscopia no Ultra Violeta.	41
5.7	Espectroscopia de Dicroísmo Circular.	42

5.7.1	Determinação da composição de estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina	43
5.7.2	Estudo da desnaturação térmica da isoforma γ -tripsina por dicroísmo circular	43
5.8	Análise dos dados de termodinâmica.	44
5.8.1	Cálculo dos parâmetros termodinâmicos	44
5.8.2	Índice de cooperatividade (CI)	47
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1	Purificação e pureza	48
6.2	Análise estrutural da origem das isoformas γ - e α -tripsina	51
6.3	Caracterização enzimática	54
6.3.1	Avaliação da atividade enzimática amidásica e esterásica em função do pH das isoformas γ - e α -tripsina bovina	54
6.3.2	Avaliação da atividade enzimática amidásica e esterásica em função da adição de Cloreto de Cálcio para as isoformas γ - e α -tripsina	57
6.3.3	Avaliação da atividade amidásica em função da adição de cloreto de sódio para as isoformas γ - e α -tripsina	61
6.3.4	Perfil de estabilidade térmica em função do tempo e temperatura para as isoformas γ - e α -tripsina	64
6.4	Dicroísmo circular	66
6.4.1	Determinação da estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina	66
6.5	Volume hidrodinâmico das isoformas γ - e α -tripsina em pH 3,0	68
6.6	Potencial zeta, carga superficial e fator de retenção k das isoformas γ - e α -tripsina em pH 3,0	69
6.7	Estabilidade térmica	70
6.7.1	Espectroscopia ultravioleta	70
6.7.2	Dicroísmo circular	74
7	CONCLUSÃO	80
8	PERSPECTIVAS	81
9	REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Superposição estrutural de cinco serino proteases e de seus sítios ativos nas respectivas enzimas: quimotripsina bovina (amarelo), calicreina porcina (rosa), tripsina bovina (azul), tonina de rato (cinza) e elastase porcina (verde). (Prolysis: <http://delphy.phis.univ-tours.fr/Prolysis>)..... 17
- Figura 2: A reação geral das proteases para hidrólise de ligação peptídica. 17
- Figura 3: Sequência dos 229 resíduos de aminoácidos do tripsinogênio bovino. Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys é o hexapeptídeo N-terminal liberado na conversão de tripsinogênio à β -tripsina. His(46), Asp(90), Ser(183) são os resíduos de aminoácidos que participam da tríade catalítica. CYS são as cisteínas que participam das pontes dissulfeto e Lys (131)-Ser (132) indica o ponto de clivagem para conversão de β - para α -tripsina e Lys (176)-Asp (177) mostra o ponto de clivagem para conversão de α - em ψ - tripsina. Numeração baseada na sequência da β -tripsina (5ptp.pdb). 18
- Figura 4: Conversão de tripsinogênio nas isoformas de tripsina. *A beta-tripsina recém formada também atua na ativação junto à enteroquinase e nas clivagens adicionais 19
- Figura 5: Pontos de clivagem na conversão de tripsinogênio para gerar as isoformas ativas de tripsina bovina, as setas indicam o local onde ocorreu uma clivagem proteolítica. I- tripsinogênio, II- β -tripsina, III α -tripsina, IV ψ -tripsina. (KEIL, 1971). .21
- Figura 6: Pontos de clivagem na conversão de tripsinogênio para as isoformas ativas de tripsina bovina, as setas indicam onde ocorreu uma clivagem proteolítica (TEIXEIRA, 1977).....22
- Figura 7: (A) Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina. O primeiro domínio está realçado em cor azul (1-105) e o segundo domínio realçado em cor vermelha (106-223). O resíduo de aminoácido N-terminal está representado em cor laranja e o C-terminal em cor verde. Os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica estão representados em modo de bastão: Ser (amarelo), His (lilás) e Asp (verde). (B) Domínios isolados da isoforma β -tripsina em forma de beta-barris (figura feita no Rasmol a partir de 5ptp.pdb).23
- Figura 8: Disposição das pontes dissulfeto na isoforma β -tripsina. O primeiro domínio (verde) possui uma ponte dissulfeto (amarelo). O segundo domínio (cinza) possui quatro pontes dissulfeto (vermelho). Os dois domínios são ligados por uma ponte dissulfeto (ponte interdomínio) (amarelo-vermelho) (5ptp.pdB).24

Figura 9: Sítio de ligação ao íon metálico cálcio na isoforma β -tripsina. O íon metálico Ca(II) é representado por uma esfera de cor laranja acondicionada em uma alça da molécula de proteína.25

Figura 10: Cromatografia de troca catiônica de tripsina comercial bovina Sigma Tipo I lote 8003. Condições cromatográficas: fluxo de $15 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ sobre a fase estacionária SE-Sephadex, quantidade de partida de 1,0 g, usando uma fase móvel de $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tris HCl, pH 7,1 a 4°C , $20,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaCl_2 e $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Benzamidina. Foram coletados 5 mL por tudo e os mesmos foram detectados a 280 nm (—) e (----) é a deconvolução matemática do perfil. De acordo com a área sob a curva correspondente a cada isoforma foi calculada sua porcentagem de composição da amostra total. Os valores sobrescritos nos símbolos gregos indica a porcentagem relativa de cada isoforma na composição da amostra total e os subscritos são as massas moleculares determinadas por espectrometria de massa do tipo Maldi-TOF.....49

Figura 11: Espectrometria de massa da isoforma γ -tripsina. Detecção realizada em MALDI-TOF-MS (Autoflex-Bruker) no modo linear positivo. $(\text{M}+\text{H})^+$ é a molécula de γ -tripsina carregada com um próton e em $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$ esta carregada com dois prótons.51

Figura 12: Posição de clivagem na isoforma β -tripsina bovina para conversão em γ - ou em α -tripsina bovina. Imagens em “spacefill” geradas no Rasmol[®] a partir da estrutura da β -tripsina bovina (1S0Q.pdb). Em A e B os segmentos em vermelho e azul respectivamente marcam o ponto de clivagem para conversão em α -tripsina e γ -tripsina. Em C e D a região próxima ao ponto de clivagem foi colorida de acordo com temperatura, que demonstra a mobilidade da região (altos valores são coloridos em cores mais quentes (vermelho) e os valores mais baixos em mais frios (azuis)).53

Figura 13: Atividade amidásica da isoforma γ -tripsina em função do pH e da α -tripsina em pH 8,0 usando o substrato BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão..55

Figura 14: Atividade esterásica das isoformas γ - e α -tripsina em função do pH usando como substrato o BAEE. O cromóforo foi detectado a 253 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.....56

Figura 15: Atividade amidásica das isoformas γ - e α -tripsina, em função da adição de diferentes concentrações de CaCl_2 , em tampão Tris-HCl $50,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0 usando como substrato o BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.....58

Figura 16: Atividade esterásica das isoformas γ - e α -tripsina em função da adição de CaCl_2 , em tampão Tris-HCl $50,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,0, usando como substrato o BAPNA.

O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.....	59
Figura 17: Série de Hofmeister,(JAKUBOWSKI, 2013).....	61
Figura 18: Atividade amidásica das isoformas γ - e α -tripsina em função da adição de NaCl, em tampão Tris-HCl 100,0 mmol.L ⁻¹ , pH 8,0, usando como substrato o BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.	63
Figura 19: Atividade amidásica das isoformas γ - e α -tripsina em diferentes temperaturas em função do tempo, para γ -tripsina foi feito de 298,15 a 348,15 K (variando 10 K) durante 90 minutos (com medidas a cada 10 minutos) e para α -tripsina foi feito nas temperaturas 318,15/ 328,15/ e 338,15 K durante 50 minutos (com medidas a cada 10 minutos), em tampão Tris-HCl 50,0 mmol.L ⁻¹ , pH 8,0 contendo CaCl ₂ a 20,0 mmol.L ⁻¹ usando como substrato o BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.....	65
Figura 20: Espectro de dicroísmo circular das isoformas γ - e α -tripsina, em tampão fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L ⁻¹ , pH 3,0 a 298,15 K, para determinação da composição de estrutura secundária.....	67
Figura 21: Sobreposição dos cromatogramas das isoformas γ - e α -tripsina obtidos por cromatografia de exclusão molecular, utilizando como fase móvel tampão glicina a 100,0 mmol.L ⁻¹ , pH 3,0, contendo CaCl ₂ a 20,0 mmol.L ⁻¹ eluindo em fluxo de 800 μ L.min ⁻¹ a 25°C, com injeção manual de 100 μ L de uma solução a 0,05 mg.mL ⁻¹ , e a absorção do eluato foi monitorada a 280 nm. E os volumes hidrodinâmicos de γ - e α -tripsina obtidos pela técnica de DLS, em tampão fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L ⁻¹ , pH 3,0 a 25 °C.	69
Figura 22: Teste de reversibilidade para γ - e α -tripsina durante o processo de desnaturação térmica. O espectro absorção com os símbolos quadrados foi adquirido na primeira temperatura do experimento (293,15 K), onde a proteína esta no estado nativo. E o espectro com símbolos triângulos foi adquirido após a proteína ter sido desnaturada por calor (aquecida até 353,15 K) e resfriada a temperatura inicial.	72
Figura 23: Curva ajustada matematicamente pela equação de Boltzmann, monitorada por espectroscopia ultravioleta 285 nm, de α -tripsina (0,4 mg.mL ⁻¹), em tampão tampão glicina 50 mmol.L ⁻¹ + cloreto de cálcio 20 mmol.L ⁻¹ , pH 3,0, em diferentes temperaturas (293,15–353,15 K). T_m é temperatura media de desnaturação e ΔH é a variação de entalpia.....	73

Figura 24: Curva de desnaturação térmica. (A) Curva ajustada matematicamente no modelo sigmoidal que pode ser considerado um modelo de transição de dois estados, monitorada por dicroísmo circular a 205 nm, de γ -tripsina ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$), em tampão 30 mmol.L^{-1} fosfato de sódio monobásico, pH 3.0, em diferentes temperaturas ($298,15\text{--}344,15 \text{ K}$). T_m é temperatura média de desnaturação e ΔH é a variação de entalpia (B) Curva normalizada da fração desnaturada em cada temperatura a partir dos resultados da curva A.....76

Figura 25: Representação esquemática do raio hidrodinâmico, (A) representa a γ -tripsina e (B) a α -tripsina. R é o raio total da molécula, R1 o raio da camada interna e R2 o raio da camada externa.78

Figura 26: Resumo de alguns parâmetros físicos químicos comparativos entre γ -, α - e β -tripsina.79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição em estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina, em pH 3,0, obtida através do espectro de dicroísmo circular, analisado pelo software CDSSTR®.....	67
Tabela 2: Potencial zeta, carga superficial e fator de retenção k, de γ - e α -tripsina em pH 3,0.....	70
Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos das isoformas γ - e α -tripsina em pH 3,0.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

BAEE - N α -Benzoil-L-arginina etil éster.

BAPNA - N α -Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida .

CD – Dicroísmo Circular.

CI – Índice de cooperatividade.

Core – Centro ou núcleo.

DLS – Espalhamento dinâmico de luz.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

DSC – Differential Scanning Calorimetry ou Calorimetria Diferencial de varredura.

Loop – Alça ou porção de desordenada da proteína.

MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation ou Ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada a detector de tempo de vôo.

MES - Ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado.

MS - Espectrometria de massas.

nm – Nanômetro .

PDB – Protein Data Bank, banco de dados de estruturas e sequência de proteínas.

Spacefill - é um modelo molecular tridimensional, onde os átomos são representadas por esferas cujos raios são proporcionais ao raio dos átomos.

T_m - Temperatura na qual a proteína tem sua estrutura desnaturada em 50 % a quente.

TRIS - tris (hidroximetil) aminometano.

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo.

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais.

UV – Ultra Violeta.

ΔC_p - Variação da capacidade calorífica entre estados organizados e desorganizados.

ΔG - Variação de energia livre. de Gibbs.

ΔH - Variação de entalpia.

ΔH_{cal} - Variação de entalpia quando uma molécula desnatura, calculada pela integral da área da curva de $C_p \times T$.

ΔH_{VH} - Descreve a dependência da constante de equilíbrio (K) em função da temperatura.

RESUMO

Uma nova isoforma tripsina bovina foi purificada a partir de amostras comerciais por cromatografia de troca iônica por Sephadex SP C50[®]. A nova isoforma contém, além da perda do hexapeptídeo N-terminal (como encontrado na molécula progenitora β -tripsina) uma clivagem intra-cadeia entre o Lys-155 e Ser-156. A nova enzima denominada γ -tripsina mostrou propriedades similares com a isoforma α -tripsina que contém o mesmo número de cadeia polipeptídica (duas cadeias), massa molecular (23312 Da), estrutura secundária, volume hidrodinâmico e outros. Apesar das semelhanças estruturais e enzimáticas dessas duas isoformas, γ -tripsina tem uma taxa de formação inferior a partir da β -tripsina, carga superficial inferior, mas a γ -tripsina tem estabilidade térmica mais elevada do que a α -tripsina. Devido à facilidade de purificação das isoformas a partir de tripsina bovina de fonte comercial, e as propriedades descritas acima, esta enzima tornar-se uma alternativa interessante para a indústria de alimentos e de detergente, bem como para pesquisa de biocatalisadores.

Palavras chaves: isoformas de tripsina, físico química, γ -tripsina, atividade enzimática, estabilidade de proteínas.

ABSTRACT

A novel bovine trypsin isoform was purified from commercial sample by ion exchange chromatography by Sephadex SP C50[®]. New isoform contain in addition of loss of N- terminus hexapeptide (as found in parent molecule β -trypsin) an intra-chain split between Lys-155 and Ser-156. The novel enzyme denominate gamma-trypsin showed similar properties with α -trypsin isoform in: polypeptide number chain (two chain), molecular masses (23,312 Da), secondary structure, hydrodynamic radius and others. In spite of enzymatic and structural similarities of both isoforms, γ -trypsin preferably has a lower rate formation from β -trypsin, a lower surface charge, but the gamma-trypsin has a higher thermal stability than α -trypsin. Due to obtaining facility of purification of bovine trypsin isoforms from commercial font, and properties described above, become this enzyme an interesting alternative for the food industry, detergent and biocatalysis research.

Key words: trypsin isoforms, physicochemical, γ -trypsin, enzymatic activity, protein stability.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serino proteases

A tripsina é um modelo interessante para o estudo termodinâmico, já que as propriedades básicas de algumas isoformas já são conhecidas como: estrutura tridimensional e atividade enzimática e alguns dados sobre estabilidade térmica.

1.1.1 Características das serino proteases.

A tripsina, quimotripsina, elastase e trombina fazem parte da superfamília das enzimas homólogas da quimotripsina (Figura 1). Essas enzimas apresentam dois domínios similares, provavelmente originados por meio de duplicação gênica divergente contendo a tríade catalítica e a fenda oxianiônica em seu centro ativo (LESK; FORDHAM, 1996; LESK, 2001).

As serino proteases são proteínas que hidrolisam ligações peptídicas, o mecanismo geral está mostrado na Figura 2, cada uma delas apresenta uma especificidade em relação ao tipo de substrato a ser hidrolisado. A tripsina é específica para clivar ligações peptídicas contendo resíduos com cadeia lateral que possui carga elétrica positiva, em condições fisiológicas, tais como a arginina (Arg) e lisina (Lys), na posição R1. Vários processos fisiológicos são relacionados às atividades dessas enzimas como, por exemplo, a digestão (BARRETT, 1970), a coagulação sanguínea (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991), fertilização (BABA et al., 1989) e outros. Essas enzimas estão presentes em vírus, bactérias, plantas e animais (LESK; FORDHAM, 1996; LESK, 2001).

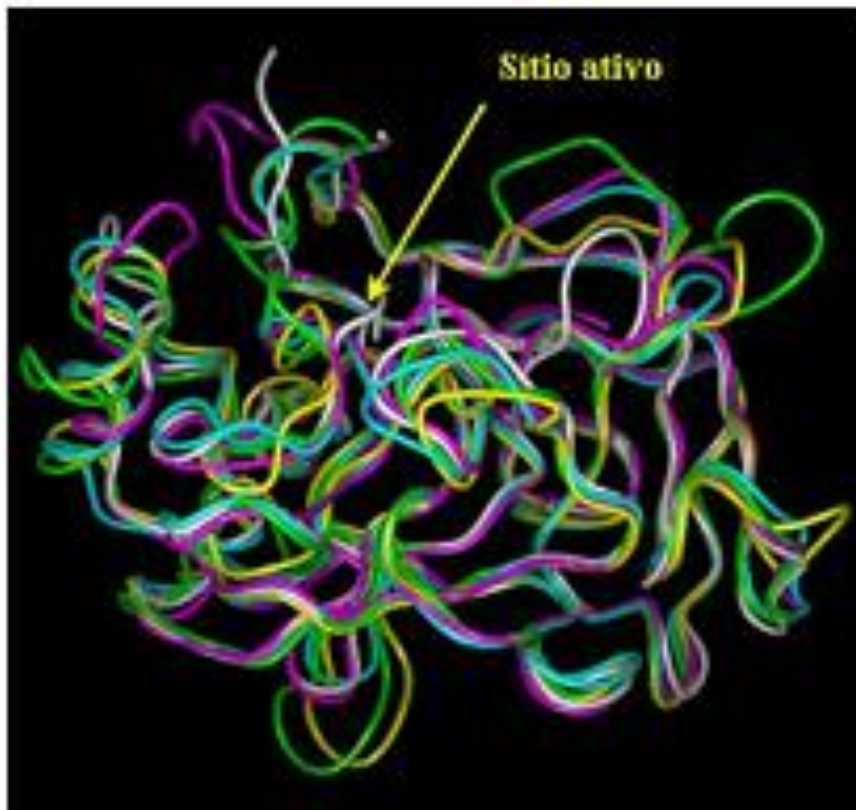


Figura 1: Superposição estrutural de cinco serino proteases e de seus sítios ativos nas respectivas enzimas: quimotripsina bovina (amarelo), calicreina porcina (rosa), tripsina bovina (azul), tonina de rato (cinza) e elastase porcina (verde). (Prolysis: <http://delphy.phis.univ-tours.fr/Prolysis>).

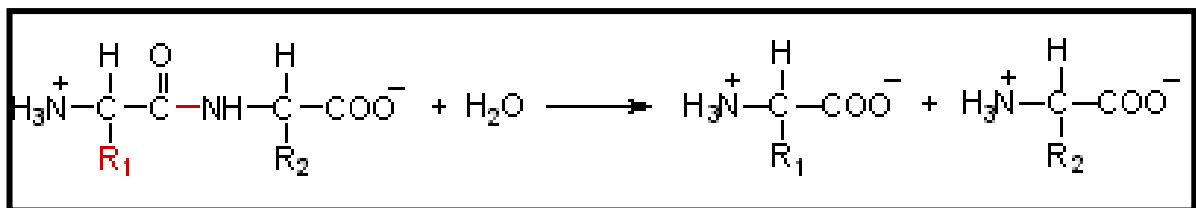


Figura 2: A reação geral das proteases para hidrólise de ligação peptídica.

INTRODUÇÃO

1.1.2 Estrutura primária do tripsinogênio e das isoformas de tripsina.

Muitas são as fontes onde podem ser encontradas as sequências primárias de tripsinogênio e de tripsina (EYL; INAGAMI, 1970; MIKES et al., 1966; WALSH; NEURATH, 1964). Apesar disso existe uma ligeira confusão em relação à numeração dos resíduos de aminoácidos devido ao modo como foi feita à descrição da sequência por alguns autores. Quando a sequência da tripsina é descrita utilizando-se como base de comparação a sequência do tripsinogênio o seu N-terminal inicia-se na Ile (7) (Figura 3).

					VAL	ASP	ASP	ASP	ASP	LYS		006
007	ILE	VAL	GLY	GLY	TYR	THR	CYS	GLY	ALA	ASN		016
	THR	VAL	PRO	TYR	GLN	VAL	SER	LEU	ASN	SER		026
	GLY	TYR	HIS	PHE	CYS	GLY	GLY	SER	LEU	ILE		036
	ASN	SER	GLN	TRP	VAL	VAL	SER	ALA	ALA	HIS		046
	CYS	TYR	LYS	SER	GLY	ILE	GLN	VAL	ARG	LEU		056
	GLY	GLN	ASP	ASN	ILE	ASN	VAL	VAL	GLU	GLY		066
	ASN	GLU	GLN	PHE	ILE	SER	ALA	SER	LYS	SER		076
	ILE	VAL	HIS	PRO	SER	TYR	ASN	SER	ASN	THR		086
	LEU	ASN	ASN	ASP	ILE	MET	LEU	ILE	LYS	LEU		096
	LYS	SER	ALA	ALA	SER	LEU	ASN	SER	ARG	VAL		106
	ALA	SER	ILE	SER	LEU	PRO	THR	SER	CYS	ALA		116
	SER	ALA	GLY	THR	GLN	CYS	LEU	ILE	SER	GLY		126
	TRP	GLY	ASN	THR	LYS	SER	SER	GLY	THR	SER		136
	TYR	PRO	ASP	VAL	LEU	LYS	CYS	LEU	LYS	ALA		146
	PRO	ILE	LEU	SER	ASP	SER	SER	CYS	LYS	SER		156
	ALA	TYR	PRO	GLY	GLN	ILE	THR	SER	ASN	MET		166
	PHE	CYS	ALA	GLY	TYR	LEU	GLU	GLY	GLY	LYS		176
	ASP	SER	CYS	GLN	GLY	ASP	SER	GLY	GLY	PRO		186
	VAL	VAL	CYS	SER	GLY	LYS	LEU	GLN	GLY	ILE		196
	VAL	SER	TRP	GLY	SER	GLY	CYS	ALA	GLN	LYS		206
	ASN	LYS	PRO	GLY	VAL	TYR	THR	LYS	VAL	CYS		216
	ASN	TYR	VAL	SER	TRP	ILE	LYS	GLN	THR	ILE		226
	ALA	SER	ASN									

Figura 3: Sequência dos 229 resíduos de aminoácidos do tripsinogênio bovino. Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys é o hexapeptídeo N-terminal liberado na conversão de tripsinogênio à β -tripsina. His(46), Asp(90), Ser(183) são os resíduos de aminoácidos que participam da tríade catalítica. CYS são as cisteínas que participam das pontes dissulfeto e Lys (131)-Ser (132) indica o ponto de clivagem para conversão de β - para α -tripsina e Lys (176)-Asp (177) mostra o ponto de clivagem para conversão de α - em ψ - tripsina. Numeração baseada na sequência da β -tripsina (5ptp.pdb).

INTRODUÇÃO

Para obtenção dessa sequência (Figura 3) foi necessário observar atentamente a sequência fornecida pelo arquivo 5ptp.pdb para posteriormente escrever a sequência a partir de dados da sequência mãe que é baseada na sequência do quimotripsinogênio. Uma das dificuldades encontradas na sequência fornecida pelo Protein Data Bank é a existência de muitos “gaps” ou espaços, e repetições numéricas entre aminoácidos que não são descontadas da numeração linear. Assim o erro se propaga e provoca um deslocamento de aminoácidos de sua posição natural. Muitos destes “gaps” são devidos a baixos índices de alinhamento (dados cristalográficos) entre a molécula teste e a molécula mãe. A numeração usada nesta dissertação foi fornecida por Keil, 1971 onde a sequência N-terminal inicia-se com a Ile (7).

1.1.3 Ativação do tripsinogênio e formação das isoformas de tripsina.

A tripsina bovina é uma enzima proteolítica produzida nas células acinares do tecido pancreático, na forma de seu zimogênio (tripsinogênio) que tem atividade proteolítica restrita. Seguindo sua secreção no intestino, o tripsinogênio é convertido para a forma ativa da tripsina (β -tripsina), reação esta catalisada pela enteroquinase e pela própria β -tripsina, recém-formada (auto-ativação) (BODE; FEHLHAMMER; HUBER, 1976; BODE; SCHWAGER; HUBER, 1978) (Figura 4).

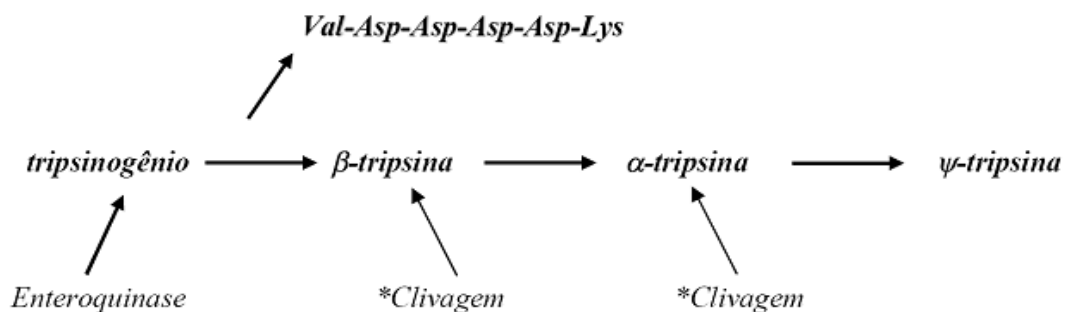


Figura 4: Conversão de tripsinogênio nas isoformas de tripsina. *A beta-tripsina recém formada também atua na ativação junto à enteroquinase e nas clivagens adicionais

INTRODUÇÃO

A conversão do tripsinogênio na isoforma β -tripsina consiste na clivagem da ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos Lys (6) e Ile (7) (nomenclatura baseada na sequência do tripsinogênio) no lado carboxílico o que promove a saída do hexapeptídeo N-terminal (Figura 4) Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys..... (DAVIE; NEURATH, 1955).

O recém-formado grupo α -amino da Ile (7) forma uma ponte salina com o resíduo Asp (194) (PERKINS; WUTHRICH, 1980) introduzindo, assim, significativas modificações estruturais na nova molécula formada (β -tripsina). No tripsinogênio o sítio de especificidade e o espaço oxianiónico estão impropriamente formados, mas mesmo assim este apresenta uma atividade residual de aproximadamente 0,5 % da atividade da β -tripsina. Essa nova conformação assumida pela β -tripsina faz com que ela se torne 200 vezes mais ativa (ROBINSON; NEURATH; WALSHY, 1973) que o tripsinogênio.

Seguindo-se o processo de autólise após a formação da β -tripsina, a sequência peptídica desta isoforma sofre uma clivagem adicional entre os resíduos Lys (131) e Ser (132) (Figura 5), originando uma segunda forma ativa da tripsina, conhecida como α -tripsina (SCHROEDER; SHAW, 1968). A α -tripsina formada possui basicamente a mesma estrutura secundária da isoforma β -tripsina, sendo a diferença baseada na menor porcentagem de estruturas em folha beta (FOUCAULT et al., 1974). Contudo, apresenta-se 40% menos ativa que a β -tripsina frente ao substrato amidásico N- α -Benzoyl-DL-arginina p-Nitroanilida (BApNA) e nenhuma diferença significativa frente a substratos ésteres como acetato de p-nitrofenila, em pH ótimo (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974).

Uma terceira isoforma de tripsina é gerada quando ocorre uma nova clivagem entre os resíduos Lys (176) e Asp (177) (Figura 5) resultando na ψ -tripsina, que possui três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes dissulfeto (Smith & Shaw, 1969). Essa nova isoforma é menos específica que as demais isoformas e possui uma insignificante atividade amidásica frente a substratos sintéticos (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974; FOUCAULT et al., 1974).

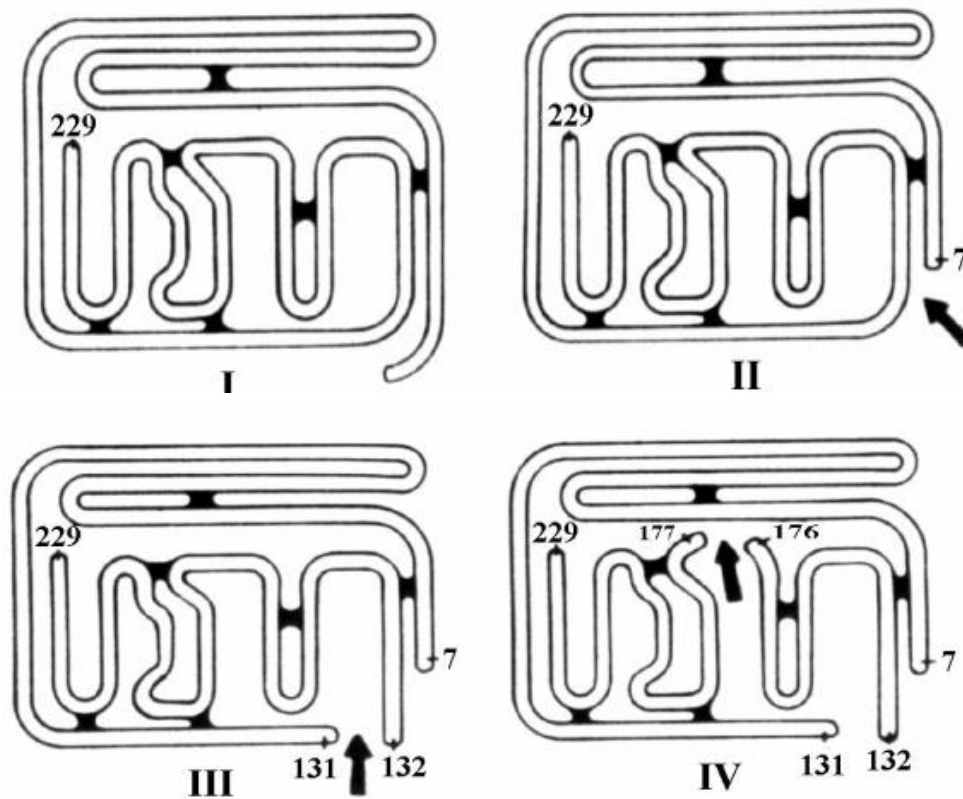


Figura 5: Pontos de clivagem na conversão de tripsinogênio para gerar as isoformas ativas de tripsina bovina, as setas indicam o local onde ocorreu uma clivagem proteolítica. I- tripsinogênio, II- β -tripsina, III α -tripsina, IV ψ -tripsina. (KEIL, 1971).

Uma quarta isoforma ativa da tripsina (Figura 6) observada após a clivagem entre os resíduos Lys (155) e Ser (156) foi purificada, parcialmente caracterizada e denominada de gama-tripsina (γ -tripsina). Seus dois resíduos N-terminais são isoleucina e serina e os C-terminais são lisina e asparagina (TEIXEIRA, 1977).

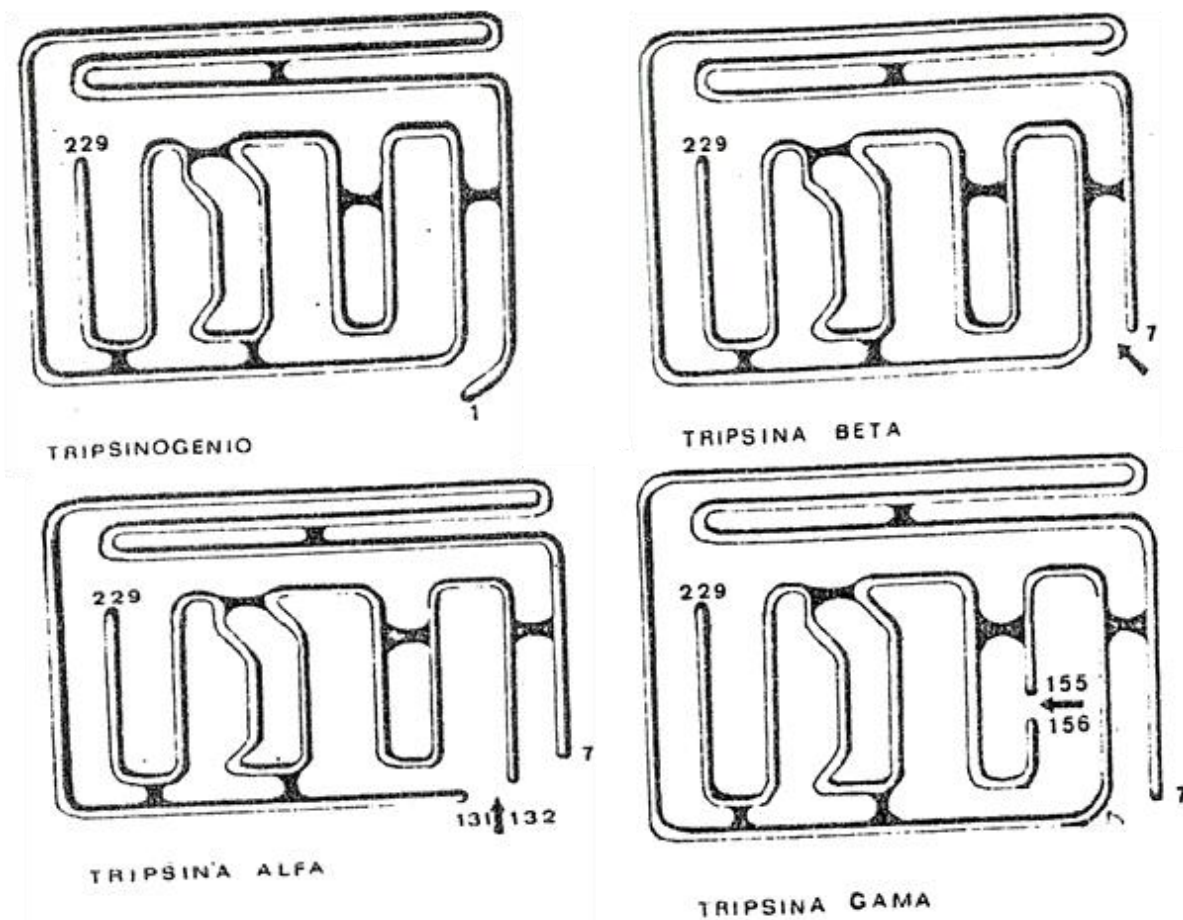


Figura 6: Pontos de clivagem na conversão de tripsinogênio para as isoformas ativas de tripsina bovina, as setas indicam onde ocorreu uma clivagem proteolítica (TEIXEIRA, 1977).

Outras isoformas de tripsina formam-se ainda durante o processo de ativação, porém algumas delas possuem atividades proteolíticas muito baixas ou nenhuma atividade amidásica ou esterásica e algumas ainda não foram caracterizadas (MAROUX; ROVERY; DESNUELLE, 1966, 1967). A formação destes produtos inativos é fortemente inibida por cátions divalentes tais como cálcio. Na ausência destes íons a quantidade de proteínas sem atividade enzimática pode resultar até em 50% do zimogênio que foi ativado. Em concentrações de 10 a 20 mmol.L⁻¹ de íons cálcio, estes aceleram a quebra seletiva da ligação entre Lys (6) e Ile (7), deste modo promovendo a formação de β -tripsina, evitando-se assim clivagens não específicas (MCDONALD; KUNITZ, 1941).

INTRODUÇÃO

1.1.4 Estruturas secundária e terciária

No que se refere à estrutura tridimensional da tripsina pode-se observar, por métodos cristalográficos, que a molécula de β -tripsina apresenta um arranjo tridimensional globular com dois domínios de estruturas similares (BODE; FEHLHAMMER; HUBER, 1976; BODE; SCHAWAGER, 1975; BODE; SCHWAGER; HUBER, 1978). O primeiro domínio compreende do 1º resíduo de aminoácido ao 105º e o segundo do 106º ao 223º, estes domínios estão unidos assimetricamente, e entre eles está localizado o sítio catalítico. A estrutura secundária da isoforma β -tripsina apresenta 85% de identidade com o tripsinogênio e é principalmente caracterizada por apresentar estruturas do tipo folhas beta-antiparalelas (Figura 7 A) que juntas se organizam formando dois betas barris unidos assimetricamente (Figura 7 B) contendo pequenos segmentos de alfa-hélice (Figura 7).

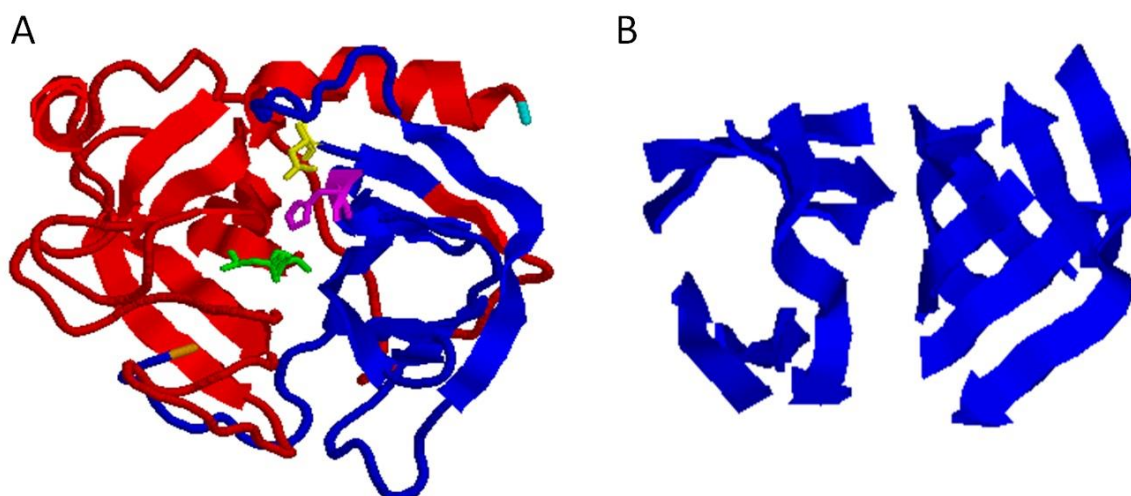


Figura 7: (A) Estrutura tridimensional de β -tripsina bovina. O primeiro domínio está realçado em cor azul (1-105) e o segundo domínio realçado em cor vermelha (106-223). O resíduo de aminoácido N-terminal está representado em cor laranja e o C-terminal em cor verde. Os resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica estão representados em modo de bastão: Ser (amarelo), His (lilás) e Asp (verde). (B) Domínios isolados da isoforma β -tripsina em forma de beta-barris (figura feita no Rasmol a partir de 5ptp.pdb).

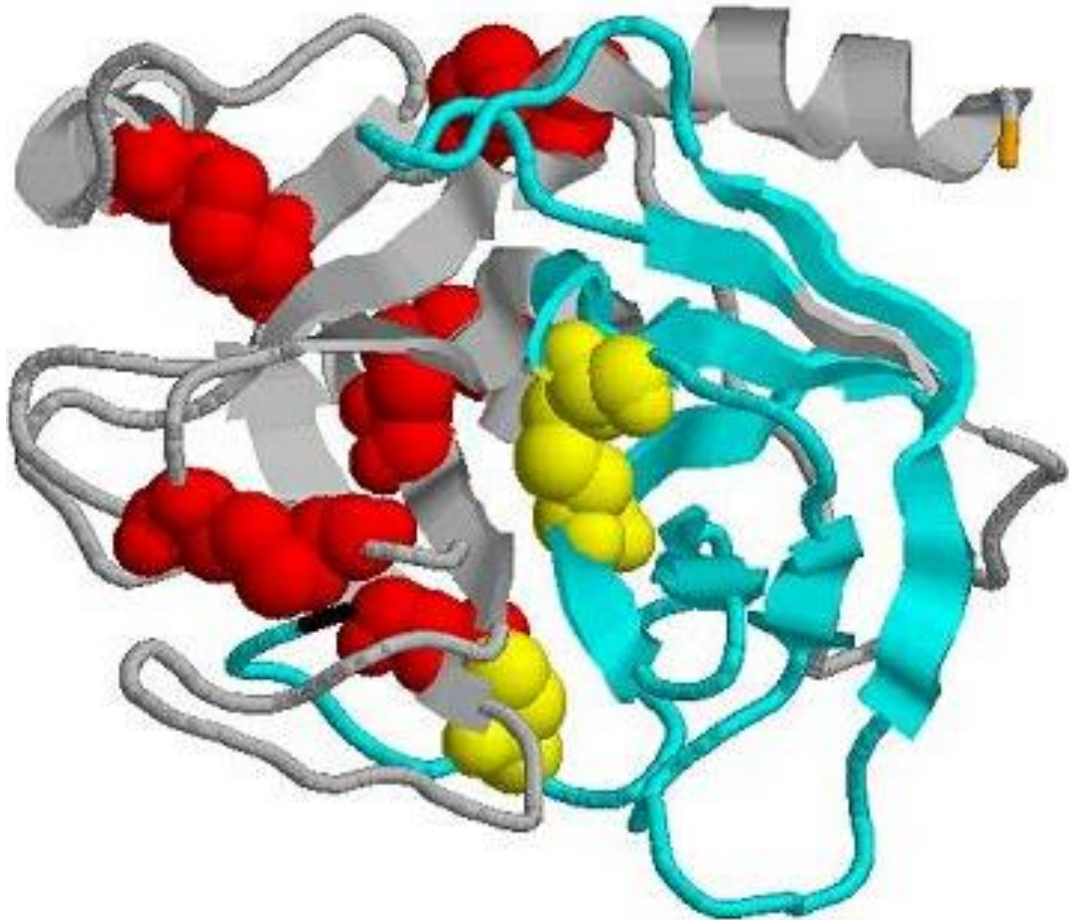


Figura 8: Disposição das pontes dissulfeto na isoforma β -tripsina. O primeiro domínio (verde) possui uma ponte dissulfeto (amarelo). O segundo domínio (cinza) possui quatro pontes dissulfeto (vermelho). Os dois domínios são ligados por uma ponte dissulfeto (ponte interdomínio) (amarelo-vermelho) (5ptp.pdB).

O tripsinogênio e as isoformas de tripsina (β , α e ψ) são constituídos, respectivamente, por uma, duas e três cadeias polipeptídicas sendo essas cadeias interligadas por seis pontes dissulfeto (Figura 8) localizadas nos resíduos Cys (13)-Cys (143), Cys (31)-Cys (47), Cys (115)-Cys (216), Cys (122)-Cys (189), Cys (154)-Cys (168) e Cys (179)-Cys (203) (MIKES et al., 1966; WALSH; NEURATH, 1964). A ponte dissulfeto (13-143) interliga os dois domínios, enquanto que as pontes dissulfeto restantes são intradomínios. O primeiro domínio possui uma ponte dissulfeto (Cys (31)-Cys (47)) e as outras quatro pontes estão no segundo domínio.

INTRODUÇÃO

Tanto o tripsinogênio como as moléculas de tripsina possuem sítios específicos para ligação do íon metálico cálcio. No tripsinogênio o primeiro sítio de baixa afinidade com $pKCa^{2+} = 1,8$ é constituído principalmente pelas cadeias laterais de dois resíduos de aminoácidos na porção N-terminal Asp (4) e (5) e outros aminoácidos mais internos e uma molécula de água, o outro sítio de ligação possui alta afinidade com $pKCa^{2+} = 3,4$ e é formado por um grupo de aminoácidos e duas moléculas de água (Glu (58), Asn (60), Val (63), Gln (68), H₂O (711) e (714)). As isoformas de tripsina possuem apenas um sítio de ligação ao cálcio (correspondente ao segundo sítio do tripsinogênio) (Figura 9), pois, o primeiro sítio de ligação é perdido com a clivagem do hexapeptídeo N-terminal (BODE; SCHAWAGER, 1975; CHIANCONE et al., 1985).



Figura 9: Sítio de ligação ao íon metálico cálcio na isoforma β -tripsina. O íon metálico Ca(II) é representado por uma esfera de cor laranja acondicionada em uma alça da molécula de proteína.

1.2 Termodinâmica de proteínas

O estudo da termodinâmica de proteínas tem atraído à atenção de várias linhas de pesquisa devido a razões diversas. Primeiro, por nos últimos trinta anos ter sido compreendido que uma molécula de proteína, consiste em muitos milhares de átomos que estão em movimento (translacional, rotacional e vibracional) dependente de variação de temperatura e este conjunto de átomos é um sistema macroscópico. Como qualquer outro sistema macroscópico, o entendimento de uma proteína requer inicialmente um conhecimento da sua termodinâmica. O segundo aspecto é que, a termodinâmica de uma proteína é esperada ser muito incomum, devido á organização espacial deste sistema macromolecular ser especialmente bem ordenado (PRIVALOV, 1989).

Cada átomo na proteína nativa ocupa uma posição definida (sujeita a oscilações) como em um cristal, mas ao contrário de um cristal a proteína não possui simetria e nem periodicidade na disposição de seus átomos. Tal sistema macroscópico ordenado e aperiódico nunca tinha sido tratado anteriormente do ponto de vista físico. Logo, não se pode prever propriedades termodinâmicas de uma dada proteína e correspondentemente, não se pode engenheirar uma nova molécula (PRIVALOV, 1989).

Sem o conhecimento da termodinâmica todas as discussões sobre os princípios da organização de uma proteína, mecanismos de enovelamento e estabilização de estruturas tridimensionais, são meras especulações. Isso se tornou óbvio apenas depois de muitos anos de tentativas, sem sucesso, de resolver esses problemas apenas analisando a informação estrutural das proteínas (PRIVALOV, 1989).

A falha desses métodos de detecção agora se torna clara, pois a informação estrutural revela apenas uma face da molécula da proteína, enquanto a outra face é revelada pela informação da base energética desta estrutura, ou seja, a sua termodinâmica. E esses dois tipos de informação não podem ser deduzidos um do outro (PRIVALOV, 1989).

INTRODUÇÃO

A estabilidade termodinâmica de uma proteína é a medida de quanto mais estável é a conformação globular ou nativa da molécula em comparação ao seu estado desnaturado (AHMAD; YADAV; TANEJA, 1992; PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990). A forma nativa da proteína, ou seja, sua estrutura terciária ou quaternária está em um mínimo de energia e demonstra vários graus de flexibilidade, principalmente na sua superfície e nas extremidades amino e carboxi-terminal, onde as cadeias laterais e as alças possuem conformações alternativas. Para que ocorra um processo no qual a proteína passe de um estado nativo para o desnaturado é necessário um aumento significativo da energia livre (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990), a temperatura ambiente e sem a ajuda de desestabilizantes.

Em contrapartida, sabendo-se que a conformação nativa das proteínas pode ser facilmente desfeita e que a cadeia polipeptídica pode desenovelar-se por meio de processos físicos (temperatura e pressão) ou químicos (variação do pH e adição de substâncias desnaturantes) (PRIVALOV, 1989), torna-se importante entender os mecanismos relacionados à estabilidade das proteínas.

A estabilidade é importante para manter a estrutura nativa da proteína, evitando-se que ela adquira outras conformações que sejam diferentes da nativa, mas também essa estabilidade não pode ser tão rígida a ponto de impedir mudanças conformacionais ou ajustes necessários às funções das mesmas (BECKTEL; SCHELLMAN, 1987; DILL et al., 2008).

A elucidação do mecanismo de enovelamento das proteínas é um importante passo para compreensão da relação entre sequência e estrutura destas. Um benefício direto desta compreensão é a capacidade de prever com mais precisão a estrutura de uma proteína, o que teria amplas implicações na bioquímica, genética e química farmacêutica (BROCKWELL; SMITH; RADFORD, 2000).

O processo reversível de enovelamento e desenovelamento das proteínas podem ser estudados por vários métodos sensíveis capazes de detectar mudanças na estrutura das moléculas, como espectrofotometria e espectroscopia de dicroísmo circular (CD) (MARTINS; SANTORO, 1999; MARTINS, 1998; MARTINS et al., 2003; NASSER BRUMANO, 2000), ressonância magnética nuclear (RMN) (TAMURA;

INTRODUÇÃO

PRIVALOV, 1997), espectroscopia de fluorescência (HILSER, 2001), cromatografia de exclusão molecular (LIGHT; HIGAKI, 1987), etc. Os métodos espectroscópicos são extremamente sensíveis e capazes de fornecer informação estrutural de alta resolução e parâmetros termodinâmicos. Eles fornecem informações indiretas, ou seja, uma determinação termodinâmica modelo dependente (processo de desnaturação deve ocorrer em dois estados), onde os principais parâmetros termodinâmicos (T_m e ΔH) são determinados através de ajustes matemáticos destas medidas.

Para que se conheça a descrição termodinâmica do sistema torna-se necessário obter dados sobre as variações de entalpia (H) e entropia (S) dos processos relacionados ao enovelamento e desenovelamento das proteínas, bem como a respeito da variação da capacidade calorífica (ΔC_p) desses estados e a sua dependência de diferentes condições de solventes sob variações de temperatura em diferentes faixas de pH, e finalmente a determinação da variação da energia livre de Gibbs (ΔG) (HAYNIE, 2001).

Tratando-se de termodinâmica é essencial que a reação de desnaturação esteja em equilíbrio antes de realizar as medidas e que esta reação seja reversível. Para determinar o tempo de equilíbrio é necessário realizar medidas em função do tempo, uma vez que diferentes proteínas em determinada condição pode exigir desde alguns minutos até dias para alcançar o equilíbrio. E a reversibilidade da reação pode ser verificada resfriando ou diluindo uma amostra pós-transição até a região de pré-transição e realizar uma nova medida que deve ser idêntica a obtida anterior ao processo de desnaturação (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990).

A maior dificuldade enfrentada para produzir um biofármaco esta relacionada a estabilidade das macromoléculas, assim a integração de pesquisas na área de bioquímica, biofísica molecular e físico-química geram conhecimentos que possibilitam compreender como sistemas biológicos se mantêm mais estáveis e então manipular estas moléculas sem que elas percam sua atividade biológica.

As isoformas α -, β - e ψ -tripsina bovina já possuem seus parâmetros termodinâmicos e físico-químicos caracterizados (BEARDSLEE; ZAHNLEY, 1973; BITTAR et al., 2003; MARTINS et al., 2003; NASSER BRUMANO, 2000; SANTOS et

al., 2008b; TISHCHENKO; GORODKOV, 1979). Assim obtendo os dados da γ -tripsina bovina vai ser possível completar a caracterização físico-química das isoformas ativas da tripsina e estudar o perfil de transformação biológica em formas menos estáveis do ponto de vista termodinâmico.

1.3 Aplicações da tripsina

1.3.1 Aplicação farmacêutica

A tripsina tem sido estudada há muito anos no que diz respeito a seu emprego farmacêutico, com ênfase no uso como droga de ação anti-inflamatória. Vários estudos comprovam sua aplicação no tratamento de doenças de caráter inflamatório e a sua associação com medicamentos analgésicos e antibióticos (aumenta a eficácia destes). A tripsina administrada por via intramuscular no tratamento de tromboflebitis (INNERFIELD; ANGRIST; SCHEARZ, 1953), foi testada para tratamento de infecções respiratórias (FIGUEROLA, 1957) e Sherry e Fletcher mostraram o uso de tripsina isolada ou associada a substâncias analgésicas e antibióticas no tratamento de desordem gastrointestinal, lise de coleções protéticas, adjuvante no tratamento tromboembólico e no tratamento de inflamações (SHERRY; FLETCHER, 1960). Pacientes portadores lesões ulcerativas, tromboflebitis e arteriosclerose nos membros inferiores, onde o uso de esteroides estava contra indicado, foram tratados com Parenzyme[®] (tripsina + alfa-quimotripsina) (MARTIN, 1960). Ungoli fez uso tópico de tripsina para digestão de tecidos necróticos (UGOLINI, 1963). Pernod e Archane notaram redução de febre, volume e viscosidade da expectoração e boa tolerância ao tratamento, com uso de tripsina e outras enzimas proteolíticas associadas ao antibiótico tetraciclina (PERNOD; ARCHAME, 1965). Pereira e Padovan comprovaram que a associação de tripsina e quimotripsina ao paracetamol é mais eficiente do que o tratamento com as enzimas ou paracetamol isolados (PEREIRA; PADOVAN, 1968). Barros em sua tese estudou a influência do Parenzyme[®] (tripsina + alfa-quimotripsina) e Parenzyme[®] analgésico (tripsina + alfa-quimotripsina+paracetamol) no desenvolvimento de tecido de granulação e observou que a ação das enzimas

INTRODUÇÃO

associadas ao paracetamol é melhor do que o uso de um dos dois isoladamente (BARROS, 1989). Outra associação terapêutica estudada e utilizada em outros países é o Phlogenzym (tripsina + bromelina + rutosídeo), com ação anti-inflamatória e com pronunciada diminuição de dor em casos de osteoartrite (KLEIN et al., 2006; MANHART et al., 2002).

Os medicamentos que contém tripsina são produzidos na forma sólida (enzimas desnaturadas) assim uma porcentagem considerável dessas proteínas quando entram em contato com os líquidos do trato gastrointestinal não voltam a sua forma nativa, resultando em baixa atividade. Assim, a indústria farmacêutica para solucionar este problema aumenta a quantidade dos princípios ativos de modo a aumentar a quantidade de moléculas ativas considerando a perda por agregação ou a não renaturação da molécula. Porém, o aumento da concentração dos princípios ativos só aumenta a contribuição da inativação das proteínas fazendo com que o processo cinético de conversão das enzimas em produtos insolúveis seja mais rápido do que o processo termodinâmico de enovelamento e desenovelamento das proteínas. Infelizmente para indústria farmacêutica trabalhar com medicamentos a base de proteínas não é o mesmo do que desenvolver fármacos de baixo peso molecular, pois cada proteína apresenta uma característica única não podendo expandir as mesmas para outros grupos de proteínas não correlatas (VELLARD, 2003). Assim, estudos sobre a termodinâmica e a estabilidade da tripsina e suas isoformas, bem como a atividade enzimática de cada isoforma isolada; são importantes para possibilitar a produção de formulações farmacêuticas mais estáveis e definir parâmetros mais claros para realizar controle de qualidade dessas formulações e fornecer a população um medicamento mais estável (maior durabilidade) e mais confiável em seu efeito.

1.3.2 Aplicação industrial

A tripsina é uma enzima proteolítica do grupo das serino proteases e esse potencial proteolítico é amplamente explorado nas indústrias de alimentos e bebidas para melhorar e facilitar o trabalho, aumentando a qualidade de massas e maciez de

INTRODUÇÃO

carnes, em produção de hidrolisados proteicos, e durante a estabilização fria de cerveja, entre outros (SHAHIDI; KAMIL, 2001; STOYTCHEVA et al., 2013).

1.3.3 Aplicação bioquímica

Na bioquímica a tripsina é utilizada em protocolos para cultura de células e tecidos, agindo por meio da reação de dissociação enzimática, que leva ao rompimento da matriz extracelular para obtenção de células individualizadas, com a finalidade de transferir as culturas para um novo substrato (BANUMATHI et al., 2009; SOLEIMANI; NADRI, 2009; YANG et al., 2009). Bem como para a identificação de proteínas por meio de técnicas de sequenciamento de peptídeos (SCHUCHERT-SHI; HAUSER, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Há grande quantidade de informações sobre a tripsina, porém na sua apresentação comercial. Desde a descoberta da existência de isoformas ativas de tripsina surgiu o desafio de investigar as características de cada isoforma isolada, uma vez que a apresentação comercial é composta pela mistura das isoformas. As isoformas α -, β - e ψ -tripsina já possuem seus parâmetros termodinâmicos e físico-químicos caracterizados (BEARDSLEE; ZAHNLEY, 1973; BITTAR et al., 2003; MARTINS et al., 2003; NASSER BRUMANO, 2000; SANTOS et al., 2008b; TISHCHENKO; GORODKOV, 1979), porém sobre a γ -tripsina existem poucas informações. A importância, farmacêutica, industrial, biotecnológica e bioquímica, da tripsina justifica trabalhos de caracterização bioquímica e físico-química com esta enzima, e sendo essa constituída por isoformas faz-se necessário estudos sobre cada isoforma isolada para conhecer suas propriedades a fim otimizar suas aplicações. Além disso, os dados obtidos podem auxiliar no delineamento do perfil de conversão e degradação biológica destas isoformas.

3 HIPÓTESE DA DISSERTAÇÃO

Se as isoformas γ - e α -tripsina são originadas a partir de uma clivagem em diferentes pontos na isoforma β -tripsina, e estas clivagens ocorrem em pontos diferentes na cadeia polipeptídica então, espera-se que as isoformas γ - e α -tripsina apresentem diferenças significativas em relação a características estruturais, enzimática e termodinâmicas.

4 OBJETIVO GERAL

Determinar parâmetros físico-químicos e estruturais da isoforma γ -tripsina comparativos isoforma α -tripsina bovina.

4.1 Objetivos Específicos

- Purificar quantidades da ordem de mg das isoformas γ - e α -tripsina bovina.
- Determinação da identidade e da pureza da isoforma γ -tripsina.
- Determinação de parâmetros enzimáticos comparativos entre as isoformas γ - e α -tripsina bovina.
- Determinação da composição da estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina bovina em meio ácido.
- Determinação do volume hidrodinâmico das isoformas γ - e α -tripsina bovina em meio ácido.
- Determinação do potencial zeta e carga superficial das isoformas γ - e α -tripsina bovina.
- Determinação da estabilidade termodinâmica da isoforma γ -tripsina bovina em meio ácido

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Purificação das isoformas de tripsina

Para os estudos da isoforma γ -tripsina, esta e a isoforma α -tripsina foram obtidas a partir da purificação de tripsina comercial bovina (Sigma Tipo I Lote 8003), que contém todas as sete isoformas. As isoformas foram isoladas por cromatografia de troca iônica catiônica de bancada utilizando a metodologia de TEIXEIRA, 1977 e SANTOS et al., 2008a. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas na UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais).

5.1.1 Determinação da massa molecular das isoformas de tripsina e pureza da γ -tripsina por espectrometria de massa

A massa molecular e a pureza das isoformas de tripsina foram determinadas por meio da técnica de espectrometria de massa usando a técnica de desorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-“Matrix assisted Laser Desorption /Ionisation-Time of Flight”).

As amostras de γ -tripsina ($0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$) foram dissolvidas em uma solução saturada de ácido sinapínico (5,0 mg solução aquosa de TFA a 3%: acetonitrila: água 1:4:5, v/v) na proporção de 1:3 (v/v) amostra:matriz, e em seguida aplicadas em triplicata ($0,5 \text{ }\mu\text{L/poço}$) sobre uma placa de aquisição de dados do MALDI (MTP Anchorchip_ 384x600) e deixada secar à temperatura ambiente.

A massa molecular foi obtida usando um AUTOFLEX_ III MALDI-ToF/ToF (Bruker™) operando no modo linear positivo. Foi realizada uma calibração linear usando o Kit de calibração da Bruker (Protein Calibration Standard II):

- Tripsinogênio $[M+ H]^+ = 23.982$
- Proteína A $[M+ H]^+ = 44.613$

- Albumina-Bovina $[M+ H]^+ = 66.431$
- Proteína A $[M+ 2H]^{2+} = 22.306$
- Albumina-Bovina $[M+ 2H]^{2+} = 33.216$

Para análise dos dados foi usado o programa Flex Analysis[®] (Bruker Daltonics), onde o dado bruto teve subtraída a linha de base seguida de um tratamento de suavização das curvas e então a proteína teve sua massa molecular determinada.

5.2 Análise estrutural da origem das isoformas γ - e α -tripsina

A fim de investigar as diferenças estruturais entre γ - e α -tripsina, foi realizada uma análise estrutural da isoforma β -tripsina, a partir da estrutura 1S0Q.pdb depositada no Protein Data Bank, usando os programas de visualização RASMOL[®] e análise estrutural Swiss PDB Viewer[®]. Foram realizadas análises estruturais para avaliação dos pontos de clivagens e regiões vizinhas, para formação de cada isoforma, notando-se as diferenças estruturais de estabilidade na formação da mesma.

5.3 Caracterização da atividade enzimática das isoformas γ - e α -tripsina

As atividades amidásica e esterásica das isoformas γ - e α -tripsina foram ensaiadas utilizando a metodologia descrita por (ASCENZI et al., 1981; ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961) usando o substrato sintético cromogênico N_{α} -Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida (BAPNA) ou N_{α} -Benzoil-L-arginina etil éster (BAEE), respectivamente.

A catálise do substrato BAEE gera o produto cromogênico N_{α} -benzoil-L-arginina, cuja absorvância é medida em 253 nm. Já o substrato BAPNA gera o

produto p-nitroanilina com leitura em 410 nm. Ambos os substratos foram armazenados em solução estoque de 90 mmol.L⁻¹ em DMSO.

Para realizar as medidas de absorvância foi utilizado o espectrofotômetro modelo NanoDrop® 2000 da Thermo. Os testes foram feitos em triplicata e o resultado foi expresso como média e desvio padrão da atividade específica (U/mg).

A atividade específica foi calculada utilizando a equação 1:

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{A * \epsilon * 10^6 / T}{C} \quad (1)$$

Onde ϵ é o coeficiente de extinção molar do produto, 8800 (cm⁻¹ M⁻¹) para p-nitroaniline (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961) e 1150 (cm⁻¹ M⁻¹) para N α -benzoil-L-arginina (WHITAKER; BENDER, 1965); A é a absorvância da amostra e T é tempo de reação em minutos. Uma unidade de atividade (U) foi definida como formação de 1 μ mol do produto por minuto e C é a quantidade de enzima utilizada na reação, em todos os ensaios enzimáticos foram utilizadas 9x10⁻⁴ mg.

5.3.1 Avaliação da atividade enzimática amidásica e esterásica em função do pH das isoformas γ - e α -tripsina.

As atividades foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Santos, 2008 com pequenas modificações. Os teste foram realizados na faixa de pH de 2,5 a 9,0 com variação de 0,5 unidades de pH.

O meio reacional foi constituído assim:

- a) Alíquota de 4,5 μ L da enzima (solução estoque a 0,2 mg.mL⁻¹);
- b) Adição de 12,5 μ L de tampão, no pH a ser testado, ao sistema 'a';
- c) Incubação a 37 °C por 10 minutos;
- d) Adição de 1 μ L do substrato teste ao sistema 'c';
- e) Incubação a 37 °C (por 15 minutos para o substrato BAPNA ou 30 minutos para o substrato BAEE);

MATERIAIS E METODOS

- f) Adição de 4,5 μL de solução aquosa de ácido acético 60% (v/v) ao sistema 'e';
- g) Alíquota de 2 μL do sistema 'f', para verificar a absorvância do produto, a 410 nm para BAPNA e 253 nm para BAEE.

O controle inclui todos os passos anteriores, mas sem a adição de enzima.

Para este estudo de variação de pH foram utilizados diferentes tampões: 50,0 mmol.L^{-1} Tris-HCl para pH 9,0/ 8,5/8,0/7,5 e 7,0; 50,0 mmol.L^{-1} MES para pH 6,5; 50,0 mmol.L^{-1} de citrato de sódio para pH 6,0/5,5/5,0/4,5/4,0 e 3,5 e 50,0 mmol.L^{-1} glicina para pH 3,0/2,5 e 2,0, todos com 20,0 mmol.L^{-1} CaCl_2 .

5.3.2 Avaliação da atividade enzimática amidásica e esterásica em função da adição de Cloreto de Cálcio das isoformas γ - e α -tripsina.

Para garantir que a quantidade do íon metálico Ca^{2+} considerada deveria ser a adicionada pelo experimentador, a solução de tripsina foi previamente dializada por fator 10^{-6} vezes, em HCl pH 3,0 a 4 °C por 24 horas, para retirada do cálcio residual do processo de purificação. Após a diálise foi utilizada metodologia descrita em 5.3.1 modificando apenas o passo 'b': Acrescentando 12,5 μL de tampão Tris-HCL 50 mmol.L^{-1} , pH 8,0 contendo a concentração teste de CaCl_2 : 0; 0,2; 0,4; 2,0; 20; 50; 100; 200 ou 300 mmol.L^{-1} de CaCl_2 . Nesta concentração de Tris-HCl, foram verificados experimentalmente que o pH do meio reacional não variava com a força iônica, nas concentrações utilizadas neste experimento.

5.3.3 Avaliação da atividade amidásica em função da adição de Cloreto de sódio das isoformas γ - e α -tripsina.

Para verificar o perfil de atividade enzimática das isoformas γ - e α -tripsina em função da adição de NaCl, foi utilizada a metodologia descrita em 5.3.1 modificando apenas o passo 'b': Acrescentando 12,5 μL de tampão contendo a concentração

teste de: 0; 0,2; 0,4; 2,0; 20; 50; 100; 200, 300, 400, 500 ou 600 mmol.L⁻¹ de NaCl. Em todos os testes realizados com as concentrações descritas acima, todos os sistemas foram tamponados com 100,0 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0. Nesta concentração de Tris-HCl, foram verificados experimentalmente que o pH do meio reacional não variava com a força iônica, nas concentrações utilizadas neste experimento.

5.3.4 Perfil de estabilidade térmica em função do tempo e temperatura das isoformas γ - e α -tripsina.

A fim de determinar o perfil de estabilidade térmica foram realizados testes nas temperaturas de 25 até 75 °C (variando 10 °C), em pH 8,0. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro Nanodrop® 2000.

O protocolo para o experimento foi:

- a) Alíquota de 22,5 μ L da enzima (solução estoque a 0,2 mg.mL⁻¹);
- b) Adição de 62,5 μ L de tampão 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0, com 20,0 mmol L⁻¹ CaCl₂;
- c) Incubação do sistema 'b' na temperatura teste por 10 minutos;
- d) Adição de 5 μ L do substrato BAPNA ao sistema 'c';
- e) Alíquota de 6 μ L do sistema 'd' a cada 10 minutos até o tempo final de 90 minutos de incubação na temperatura teste;
- f) Adição de 1,5 μ L de solução aquosa de ácido acético 60% (v/v) à alíquota 'e';
- g) Alíquota de 2 μ L do sistema 'f', para verificar a absorbância do produto.

O controle inclui todos os passos anteriores, mas sem a adição de enzima.

O pH do tampão Tris-HCL 50,0 mmol.L⁻¹, pH 8,0, foi ajustado para cada temperatura teste de acordo com dpKa/dT do Tris-HCl (-0,028/°C), para garantir que pH permanecesse o mesmo nas diferentes temperaturas.

5.4 Determinação do volume hidrodinâmico das isoformas γ - e α -tripsina

5.4.1 Cromatografia de exclusão molecular das isoformas γ - e α -tripsina

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada, separadamente para as isoformas γ - e α -tripsina, usando uma coluna cromatográfica Ultra Hydrogel™ 250 da Millipore (7,8 x 300 mm) acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta performance (Shimadzu). A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de tampão glicina a 100,0 mmol.L⁻¹, pH 3,0, contendo CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹. Foram injetados 100 μ L de uma solução a 0,05 mg.mL⁻¹. A injeção foi realizada manualmente e o sistema operou a fluxo de 800 μ L.min⁻¹ a 25°C e a absorção do eluato foi monitorada a 280 nm e 215 nm.

5.4.2 Espalhamento dinâmico de luz das isoformas γ - e α -tripsina.

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para determinar o raio hidrodinâmico das isoformas γ - e α -tripsina (1 mg.mL⁻¹) em tampão fosfato de sódio monobásico a 30 mmol.L⁻¹, pH 3,0. As condições experimentais foram as seguintes: temperatura 25 °C, 55% do poder de laser e 3 segundos de tempo de aquisição, sendo realizadas 100 aquisições de cada amostra. O equipamento utilizado foi o ProteinSolution® Dyna Pro®, acoplado ao software Dynamics® que realiza a aquisição dos dados e cálculo do raio hidrodinâmico. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de espectroscopia e calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) em Campinas - SP. Para o cálculo do volume hidrodinâmico foi considerada que a proteína é uma esfera perfeita usando a equação 2:

$$V = 4/3 \times \pi \times r^3 \quad (2)$$

Onde r é o valor do raio.

5.5 Determinação do potencial zeta e carga superficial das isoformas γ - e α -tripsina

O potencial zeta e a carga superficial das enzimas foram mensurados usando um equipamento de espelhamento dinâmico de luz (NPA152 Zetatrac, Microtrac). Foram utilizados 2,0 mL de γ - ou α -tripsina (1 mg.mL^{-1}) em tampão fosfato de sódio monobásico a 30 mmol.L^{-1} , pH 3,0, na célula de medida. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Este experimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Sistemas de Liberação Controlada - IFES – Aracruz.

5.6 Estudo da desnaturação térmica monitorada por espectroscopia no Ultra Violeta.

Para monitorar a desnaturação proteica usando espectroscopia no ultravioleta foram testados diversos métodos de acompanhamento deste processo como: variação do λ_{max} (MACH et al., 1991), variação na absorção (NASSER BRUMANO, 2000) nos comprimentos de onda específicos para PHE, TYR ou TRP e ainda a variação da segunda e quarta derivada (BALESTRIERI et al., 1978; PADRÓS et al., 1982; RAGONE et al., 1984) na curva da absorção (250-310 nm) durante o processo de desnaturação térmica. Para realização destes experimentos foi utilizado um espectrofotômetro de alta resolução (Thermo Scientific™ Evolution™ 300) localizado no Laboratório Multiusuário de Análise Biomolecular (LABIOM/UFES). Foram realizadas diversas varreduras espectrais usando amostra de tripsina comercial bovina e α -tripsina a fim de decidir qual seria a melhor concentração de proteína usar (menor concentração, que mesmo depois de desnaturada tem absorção acima do limite de quantificação e do ruído do aparelho) e quais os parâmetros (resolução e velocidade de varredura) do equipamento seriam mais adequados para aquisição dos dados para esse tipo de análise.

Após vários experimentos com variação de concentração da amostra e dos parâmetros do equipamento (resolução e velocidade de varredura) observou-se que o método mais adequado seria o descrito a seguir:

- 0,4 mg.mL⁻¹, pH 3,0 (glicina 50 mmol.L⁻¹ + cloreto de cálcio 20 mmol.L⁻¹).
- Condições espectrofotômetro:
 - Varredura de 260 a 310 nm.
 - Resolução 1 nm.
 - Passo 1 nm.
 - Velocidade de varredura 600 nm/min.
 - 10 ciclos por amostra.

Para realização da termo estatização das cubetas de amostra e de referência, foi utilizado um banho maria externo (banho ultratermostático, Quimis). A obtenção do espectro de absorção foi realizada 10 minutos após ambas as cubetas atingirem a temperatura desejada. Foram realizadas varreduras nas temperaturas de 293,15 a 353,15 K, a cada 2 K.

Para confirmação de que o processo de desnaturação proteica era reversível foi realizado teste de reversibilidade, onde após a proteína ter sido submetida ao processo de desnaturação térmica a mesma foi resfriada e então obtido um novo espectro que foi comparado com o obtido antes da desnaturação. A semelhança entre os dois espectros comprova que o processo é reversível.

Para confirmar a utilização deste método foi usado a isoforma α -tripsina como controle positivo já que a mesma possui seus parâmetros termodinâmicos determinados por calorimetria diferencial de varredura (DSC) (SANTOS et al., 2008b), assim a isoforma α -tripsina foi submetida às condições acima para que os resultados obtidos pudessem ser comparados.

5.7 Espectroscopia de Dicroísmo Circular.

Para obtenção dos dados foi utilizado um espectropolarímetro, Jasco J-810 equipado com sistema peltier de controle de temperatura. Foram adquiridos espectros do UV distante de 190-260 nm, em cubeta com caminho óptico de 1 mm. Para cada espectro da amostra foi subtraído o espectro do tampão correspondente. Um espectro representa a média de 10 acumulações, com resolução 0,5 nm, tempo

de resposta de 4 segundos e velocidade de varredura de 50 nm.min^{-1} (VIANA et al., 2010). Estes experimentos foram realizados no Laboratório de espectroscopia e calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) em Campinas.

5.7.1 Determinação da composição de estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina

A determinação da composição de estrutura secundária de γ - e α -tripsina ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$) em tampão fosfato de sódio monobásico a 30 mmol.L^{-1} , pH 3,0 foi realizada utilizando a metodologia descrita no item 5.7 a $298,15 \text{ K}$. As porcentagens das estruturas secundárias, α -hélice, folha β e “random coil” foram estimados utilizando o algoritmo e base de dados CDSSTR (JOHNSON, 1988) acessado pelo Dichroweb (WHITMORE; WALLACE, 2004). Os dados foram adquiridos no Laboratório de espectroscopia e calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) em Campinas.

5.7.2 Estudo da desnaturação térmica da isoforma γ -tripsina por dicroísmo circular

O estudo de estabilidade térmica foi realizado com γ -tripsina ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$) em tampão fosfato de sódio monobásico a 30 mmol.L^{-1} , pH 3,0. Foi utilizada a metodologia descrita no item 5.7, com variação de temperatura de $298,15 \text{ K}$ até $344,15 \text{ K}$, adquirindo dados a cada 2 K . Para monitorar o processo de desnaturação foi utilizado o sinal a 205 nm . Para avaliar a reversibilidade da desnaturação térmica a amostra desnaturada foi resfriada e então adquirido um novo espectro que foi comparado com o obtido antes do processo de desnaturação.

5.8 Análise dos dados de termodinâmica.

Para calcular parâmetros termodinâmicos a partir de dados obtidos por espectroscopia é necessário usar uma sonda que reflita a mudança que ocorre na estrutura da proteína durante o processo de desnaturação térmica. As sondas mais utilizadas e descritas na literatura são: acompanhar a mudança na segunda (BALESTRIERI et al., 1978) ou quarta (PADRÓS et al., 1982) derivada do espectro de absorção e monitorar a mudança na intensidade de absorção (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990). Independente da sonda utilizada para avaliar o processo de desnaturação térmica o resultado obtido é um gráfico sigmoidal, o qual seus parâmetros serão utilizados para obter os dados termodinâmicos, de acordo como descrito no item 5.8.1. Os dados foram analisados utilizando as sondas citadas acima para avaliar qual era melhor para analisar os dados obtidos. E a análise realizada para o experimento com a α -tripsina foi utilizada como parâmetro para escolher o método, uma vez que ela possui seus parâmetros termodinâmicos determinados (SANTOS et al., 2008b).

5.8.1 Cálculo dos parâmetros termodinâmicos

Os dados obtidos das curvas de desnaturação térmica foram submetidos a uma regressão não linear de Boltzmann, no OriginPro[®] 8.0, para obtenção de uma curva sigmoide. A partir dos dados ajustados foi calculada a fração de proteína desnaturada (f_U), segundo a equação 3 (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990), limitando os dados entre 0 e 1 onde 0 representa 100% das moléculas no estado nativo e 1, 100% no estado desnaturado. A construção de um gráfico f_U versus temperatura, foi útil para obtenção dos parâmetros termodinâmicos.

$$f_U = \frac{y_F - y}{y_F - y_U} \quad (3)$$

Onde y_F e y_U representam os valores de y característico do estado nativo e desnaturado respectivamente e y é o valor mensurado. Utilizando os dados obtidos com a equação de Boltzmann pode-se considerar o valor de y_F igual a A_1 e y_U a A_2 ,

o valor de y é corrigido utilizando a equação 4 e o valor de $y^{(1)}$ representado na equação 5 representa a inclinação da reta.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2 \quad (4)$$

$$y^{(1)} = (A_2 - A_1)/4dx \quad (5)$$

Os parâmetros A_1 , A_2 , x_0 e dx são obtidos após análise dos dados brutos com a equação de Boltzmann.

O valor de y também foi corrigido utilizando a equação 6 (COHEN; PIELAK, 1994). O valor de y obtido dever ser o mesmo para as duas formas.

$$y = \frac{(y_f + m_f/T) + (y_u + m_u) \times \exp\left\{\Delta H_m/R \times \left[\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right]\right\}}{1 + \exp\left\{\Delta H_m/R \times \left[\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right]\right\}} \quad (6)$$

Onde T é a temperatura em Kelvin, R é a constante universal dos gases, T_m é temperatura de transição e ΔH_m é a variação de entalpia no T_m . Os parâmetros y_f e y_u referem ao intercepto nas linhas de bases nativo e desnaturada, respectivamente e m_f e m_u são as inclinações das linhas de base.

Então foi calculada a constante de equilíbrio (K) e a variação de energia livre (ΔG), usando as equações 7 e 8 respectivamente (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990).

$$K = \frac{fU}{1 - fU} \quad (7)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (8)$$

Onde R é constante universal dos gases (1,987 caloria/K/mol) e T é a temperatura em Kelvin.

Com os dados obtidos da desnaturação térmica ainda é possível obter mais informações, como variação de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS).

Para o cálculo de ΔH foi utilizada a equação de van't Hoff (9) bem com as equações 11 (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990), 12 e 13 (MERGNY; LACROIX, 2003). O valor obtido pelas quatro equações é semelhante.

$$-\frac{\Delta H}{R} = \frac{d(\ln K)}{d\left(\frac{1}{T}\right)} \quad (9)$$

No gráfico $\ln K$ versus $1/T$, com os dados da transição, a inclinação da reta é igual a $d(\ln k)/d(1/T)$.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

$$\Delta H_m = T_m \times \Delta S_m \quad (11)$$

Uma vez que no T_m (temperatura que tem 50% da proteína desnaturada) ΔG é igual a zero, pois no T_m $f_U = 0,5$; então de acordo com a equação 6, $K = 1$ e como $\ln(1) = 0$.

Substituindo a equação 10 o valor de ΔG vai ser 0. Podemos assim simplificar a equação 10 (clássica para o cálculo de ΔG) para a equação 11. Onde ΔH_m vai ser ΔH no T_m e ΔS_m é igual a inclinação na reta ΔG versus temperatura, na região de transição.

$$\Delta H = 4RT_m^2 \times \left(\frac{1}{\Delta T}\right) \quad (12)$$

Onde ΔT é variação de temperatura na região de transição e x_0 corresponde ao valor de T_m .

$$\Delta H = 4RT_m^2 \times \left(\frac{df_U}{dT}\right) \quad (13)$$

Onde no gráfico f_U versus temperatura a inclinação é igual a df_U/dT e x_0 corresponde ao valor de T_m , o valor da inclinação é obtido utilizando os dados da regressão não linear de Boltzmann, sendo o valor de $y^{(1)}$ como já citado anteriormente.

5.8.2 Índice de cooperatividade (CI)

A cooperatividade é uma medida da eficiência do quanto à informação calorimétrica é passada entre as unidades internas da biomolécula e é inversamente proporcional à faixa de temperatura contida na área de transição na curva de desnaturação proteica. O CI foi calculado de acordo com a equação 14. Quanto maior o índice de cooperatividade mais cooperativa é a proteína.

$$CI = 1/\Delta T \quad (14)$$

Onde ΔT é variação de temperatura na região de transição.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Purificação e pureza

Para isolar a isoforma a ser caracterizada neste estudo, foi realizada uma cromatografia de troca catiônica de bancada seguindo o método já padronizado por Santos (SANTOS et al., 2008a) e o perfil cromatográfico obtido foi um perfil clássico de eluição para as isoformas de tripsina bovina (Figura 10), comparado com perfis relatados na literatura (SANTOS et al., 2008a; SCHROEDER; SHAW, 1968; SMITH; SHAW, 1969). Como pode ser observado na Figura 10 foram obtidos sete picos cromatográficos, sendo que destes somente três, que correspondem às isoformas β -, α - e ψ -tripsina, já foram isolados e caracterizados (BITTAR et al., 2003; MARTINS et al., 2003; SANTOS et al., 2008b; SMITH; SHAW, 1969), assim restando ainda quatro isoformas a serem estudadas. O pico cromatográfico de interesse desse estudo foi o quarto na ordem de eluição (Figura 10), que foi denominada de γ -tripsina por Teixeira em 1977 (TEIXEIRA, 1977).

Como pode ser observado na Figura 10 no geral a resolução cromatográfica entre as isoformas de tripsina foi baixa, entretanto foi considerada satisfatória para nosso propósito, pois como o objetivo principal deste trabalho foi a caracterização físico-química da isoforma γ -tripsina, pouco tempo foi gasto para otimização das condições cromatográficas. Além disso, essa condição padronizada permitiu obter quantidades suficientes da ordem de miligramas da isoforma γ -tripsina para realizar sua caracterização. A fim de selecionar uma fração da isoforma γ -tripsina pura a partir da análise do cromatograma (Figura 10) o perfil de eluição monitorado a 280 nm foi submetido a uma deconvolução matemática utilizando o software OriginPro 8[®], e os resultados podem ser observados na Figura 10 nas linhas tracejadas. Através da análise do perfil deconvolvido (Figura 10) pode ser observado que a separação entre a isoforma γ -tripsina e o pico anterior a ela não é completa e ambas possuem uma área de mistura. Para que não fosse realizada uma re-cromatografia optou-se em realizar o uso apenas dos tubos contidos na área retangular hachurada (Figura 10) que continham apenas a isoforma γ -tripsina,

mesmo levando esta medida ao baixo rendimento cromatográfico. Posteriormente esta fração foi caracterizada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (Figura 11) onde foi possível confirmar a sua pureza.

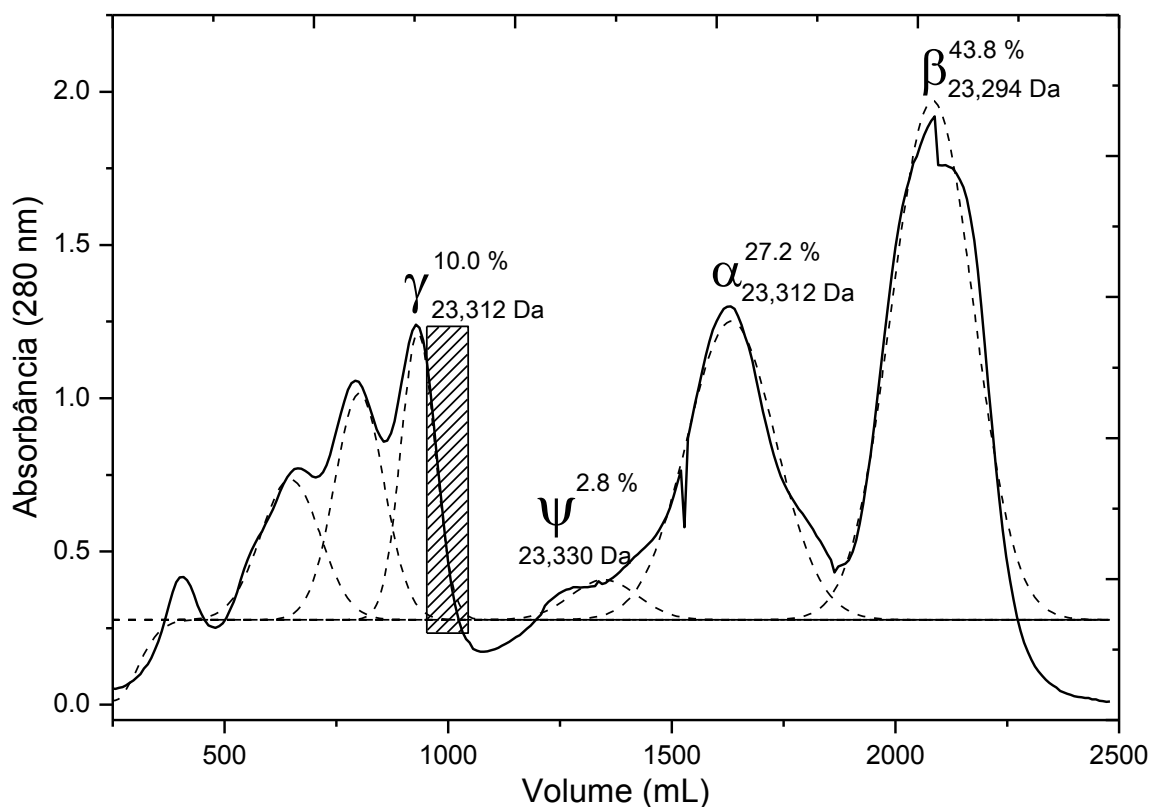


Figura 10: Cromatografia de troca catiônica de tripsina comercial bovina Sigma Tipo I lote 8003. Condições cromatográficas: fluxo de 15 mL.h^{-1} sobre a fase estacionária SE-Sephadex, quantidade de partida de 1,0 g, usando uma fase móvel de 100 mmol.L^{-1} de Tris HCl, pH 7,1 a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de CaCl_2 e 1 mmol.L^{-1} de Benzamidina. Foram coletados 5 mL por tudo e os mesmos foram detectados a 280 nm (—) e (---) é a deconvolução matemática do perfil. De acordo com a área sob a curva correspondente a cada isoforma foi calculada sua porcentagem de composição da amostra total. Os valores sobrescritos nos símbolos gregos indica a porcentagem relativa de cada isoforma na composição da amostra total e os subscritos são as massas moleculares determinadas por espectrometria de massa do tipo Maldi-TOF.

Através da deconvolução matemática do perfil cromatográfico foram obtidos também os valores da área sob a curva do pico correspondente a cada isoforma e com essa informação foi calculada porcentagem de cada isoforma em relação ao perfil cromatográfico e estes valores podem ser visualizados sobrescritos ao símbolo

grego para cada pico na Figura 10. A análise desses dados sugere que há uma preferência para a formação de α - em vez de γ - a partir de β -tripsina, pois a porcentagem de γ -tripsina é 2,7 vezes menor do que a de α -tripsina (Figura 10).

Além da caracterização cromatográfica as isoformas de tripsina foram submetidas à espectrometria de massas MALDI-TOF-MS a fim de confirmar sua identidade em função da massa molecular. As massas moleculares obtidas para as frações referentes à β -, α - e ψ -tripsina (Figura 10) estão de acordo com trabalho prévio (SANTOS et al., 2008a), confirmando a identidade das mesmas.

A pureza da fração de γ -tripsina selecionada no retângulo hachurado (Figura 10), foi avaliada por espectrometria de massas e o resultado obtido a 40 ppm de exatidão com resolução de 1 Da contido na Figura 11 demonstra que existem apenas dois picos com alta intensidade: o pico dos íons $(M+H)^+$ com valor de 23.312 m/z e o $(M+2H)^{2+}$ com valor de 11.657 m/z. Como existe uma relação matemática entre íons observados, ou seja, a relação m/z dos íons $(M+2H)^{2+}$ é metade dos $(M+H)^+$, então a massa da molécula contida no retângulo hachurado é de 23.312 Da. Este valor de massa molecular esta dentro do esperado, pois a isoforma β -tripsina possui 23.294 Da (SANTOS et al., 2008a) e na formação da isoforma γ -tripsina a partir da isoforma β - há quebra de uma ligação peptídica, então deve ser somado 18 Da nesse valor devido à inserção de um H e uma OH para estabilização das pontas formadas. A partir dos dados cromatográficos, ou seja, predição de ordem de eluição e massa molecular, pode se afirmar que a banda cromatográfica selecionada no retângulo hachurado é constituída da isoforma γ -tripsina, e que a mesma possui massa molecular semelhante à α -tripsina (SANTOS et al., 2008b).

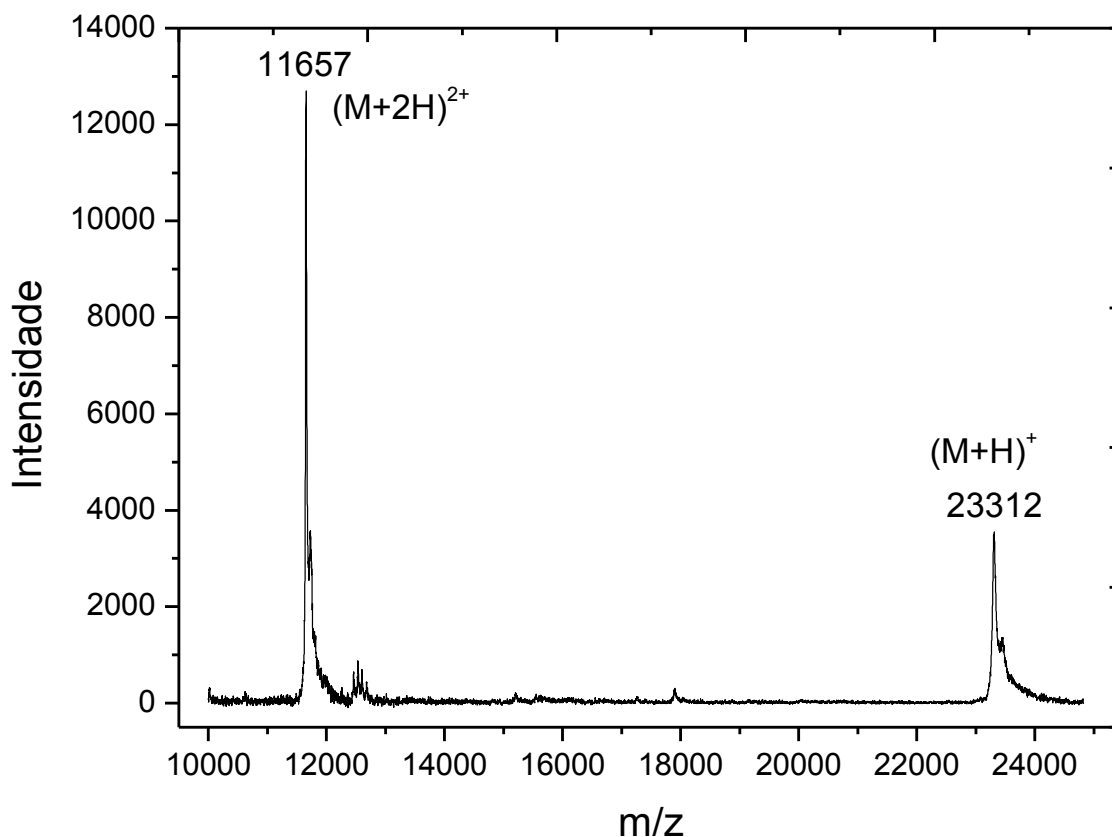


Figura 11: Espectrometria de massa da isoforma γ -tripsina. Detecção realizada em MALDI-TOF-MS (Autoflex-Bruker) no modo linear positivo. $(M+H)^+$ é a molécula de γ -tripsina carregada com um próton e em $(M+2H)^{2+}$ esta carregada com dois prótons.

6.2 Análise estrutural da origem das isoformas γ - e α -tripsina

A partir dos resultados obtidos por Teixeira sobre os pontos de clivagem na isoforma β -tripsina para formação da isoforma γ -tripsina (TEIXEIRA, 1977), podemos saber que as isoformas γ - e α -tripsina são originadas a partir de uma clivagem em diferentes pontos da cadeia polipeptídica da β -tripsina (DAVIE; NEURATH, 1955). A partir dos dados cromatográficos na Figura 10 uma sugestão de preferência de formação da isoforma α -tripsina em relação à γ -tripsina pode ser vista. Assim, uma tentativa de explicar esta preferência de formação pode ser realizada analisando a estrutura terciária da molécula β -tripsina, observando a posição dos pontos de clivagem da mesma para formar as outras isoformas. Para realização desta análise foi utilizado o cristal de proteína da β -tripsina 1S0Q.pdb depositado no Protein Data Bank e para as análises utilizou-se o programa Rasmol[®] e o Swiss PDB Viewer[®]. Na

Figura 12 foram destacados os pontos de clivagem para gerar ambas as isoformas (γ - e α -tripsina), observando em qual tipo de estrutura secundária a clivagem ocorreu bem como o grau de mobilidade da referida região.

Como pode ser visto na Figura 12 a ligação entre os resíduos Lys131-Ser132, que é o ponto de clivagem para originar a isoforma α -tripsina (região destacada em cor vermelha), esta localizada em um segmento de “loop” e na superfície da molécula de β -tripsina, estando assim em um local de fácil acesso para que ocorra a clivagem.

Na Figura 12B a ligação entre os resíduos Lys155-Ser156 (região destacada em cor azul), é o ponto de clivagem para formação da isoforma γ -tripsina, que assim como o local de clivagem para gerar a α -tripsina esta localizado na superfície da molécula, porém está em um segmento de alfa hélice. Uma vez que na porção de alfa hélice as interações entre os resíduos de aminoácidos são mais fortes do que em um “loop”, a clivagem numa porção da molécula onde as interações são mais fortes é menos provável.

Além da análise de identificação estrutural foi realizada também uma análise de mobilidade dos segmentos relacionados às transformações nas isoformas a partir da β -tripsina. Como pode ser visto nas Figura 12 C e D, a porção próxima ao local de clivagem foi colorida por temperatura ou mobilidade. O programa Rasmol[®] colore cada átomo de acordo com a temperatura anisotrópica através do valor armazenado no arquivo PDB que normalmente dá uma medida da mobilidade/incerteza da posição de um determinado átomo. Altos valores são coloridos em cores mais quentes (vermelho) e os valores mais baixos em mais frios (azuis). Tons mais claros de azul indicam maior mobilidade da região do que as coloridas em tons mais escuros. Como pode ser observado na Figura 12C a região onde ocorre a clivagem para originar a α -tripsina possui maior mobilidade (padrão de cor atribuído pelo Rasmol[®]) do que a que origina a γ -tripsina (Figura 12D). Assim, podemos supor o porquê da maior probabilidade de formar a isoforma α -tripsina a partir de β -tripsina.

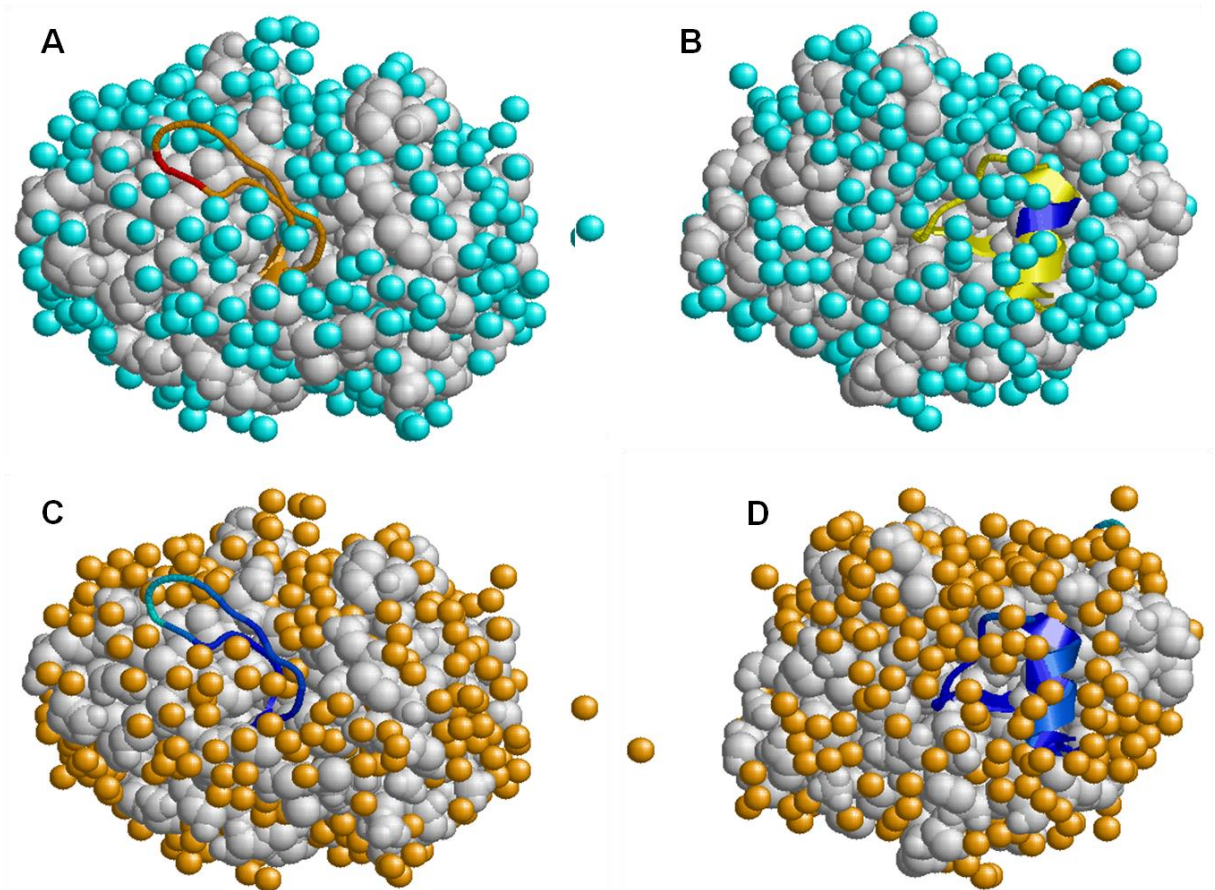


Figura 12: Posição de clivagem na isoforma β -tripsina bovina para conversão em γ - ou em α -tripsina bovina. Imagens em “spacefill” geradas no Rasmol[®] a partir da estrutura da β -tripsina bovina (1S0Q.pdb). Em A e B os segmentos em vermelho e azul respectivamente marcam o ponto de clivagem para conversão em α -tripsina e γ -tripsina. Em C e D a região próxima ao ponto de clivagem foi colorida de acordo com temperatura, que demonstra a mobilidade da região (altos valores são coloridos em cores mais quentes (vermelho) e os valores mais baixos em mais frios (azuis)).

Diante do exposto acima podemos sugerir algumas hipóteses para explicar o fato observado após o processo de purificação (Figura 10) em relação às quantidades relativa das isoformas γ - e α -tripsina. Uma sugestão interessante partindo da análise estrutural é que a diferença de estabilidade e mobilidade/exposição entre as estruturas alfa hélice e “loop” na β -tripsina, sugere que a formação de α -tripsina é favorecida devido o local de clivagem para sua formação estar localizado em uma região menos estável e de maior mobilidade e exposição. Uma região menos estável é mais fácil de ser clivada e uma região com maior mobilidade tem mais probabilidade de se afastar do interior da molécula,

assim aumenta sua exposição ao meio externo e conseqüentemente torne-se mais susceptível à clivagem em relação ao segmento que leva a formação da γ -tripsina.

6.3 Caracterização enzimática

A fim de conhecer o perfil catalítico da γ -tripsina foram realizados testes de atividade enzimática em diferentes condições e para fins de comparação em algumas destas condições a atividade da α -tripsina também foi avaliada. A escolha de comparação entre γ - e α -tripsina foi baseada no fato de que ambas são originadas da mesma proteína precursora (β -tripsina), e ambas possuem apenas uma clivagem na sua cadeia polipeptídica. Assim, tornou-se interessante observar se uma clivagem em pontos distintos da molécula de β -tripsina causaria diferentes perfis catalíticos nas isoformas originadas.

6.3.1 Avaliação da atividade enzimática amidásica e esterásica em função do pH das isoformas γ - e α -tripsina bovina

A fim de determinar o perfil de atividade da nova enzima (γ -tripsina) foram realizados testes de atividade amidásica e esterásica em função do pH. Na Figura 13 pode ser observado o perfil amidásico da γ -tripsina x pH, bem como o valor da atividade da α -tripsina em pH 8,0. Para a isoforma α -tripsina não foi realizado o perfil completo por este já ter sido realizado anteriormente por Santos (SANTOS, 2009).

Como pode ser observado na Figura 13 o perfil amidásico da isoforma γ -tripsina em diferentes valores de pH, segue o perfil típico das isoformas de tripsina (BEN KHALED et al., 2011; ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961; FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974; OUTZEN et al., 1996; SANTOS, 2009), mostrando que ela mantém sua característica básica de hidrólise de amidas em meios levemente alcalinos. Nos experimentos relatados na literatura as isoformas de tripsina possuem maior atividade amidásica em pH 8,0 e com a acidificação do meio esta atividade cai

progressivamente. Este também foi o perfil observado para γ -tripsina (Figura 13) em nosso trabalho, demonstrando que a proteína não sofreu qualquer tipo de dano irreversível e que mantém o padrão típico de atividade das isoformas de tripsina. A fim de comparar as atividades relativas entre γ - e α -tripsina foi realizada apenas uma medida de atividade da isoforma α -tripsina em pH 8. Como pode ser observado na Figura 13 não existe diferença significativa da atividade amidásica entre estas isoformas γ - e α - tripsina em pH 8. Assim, a partir de nossos dados é possível sugerir que a clivagem na cadeia polipeptídica que ambas possuem, mesmo que em diferentes pontos da estrutura não altera a capacidade catalítica da enzima frente ao substrato amidásico. Ou seja, a mudança estrutural provocada pela quebra em diferentes pontos não ocasiona uma mudança significativa ao nível do centro ativo.

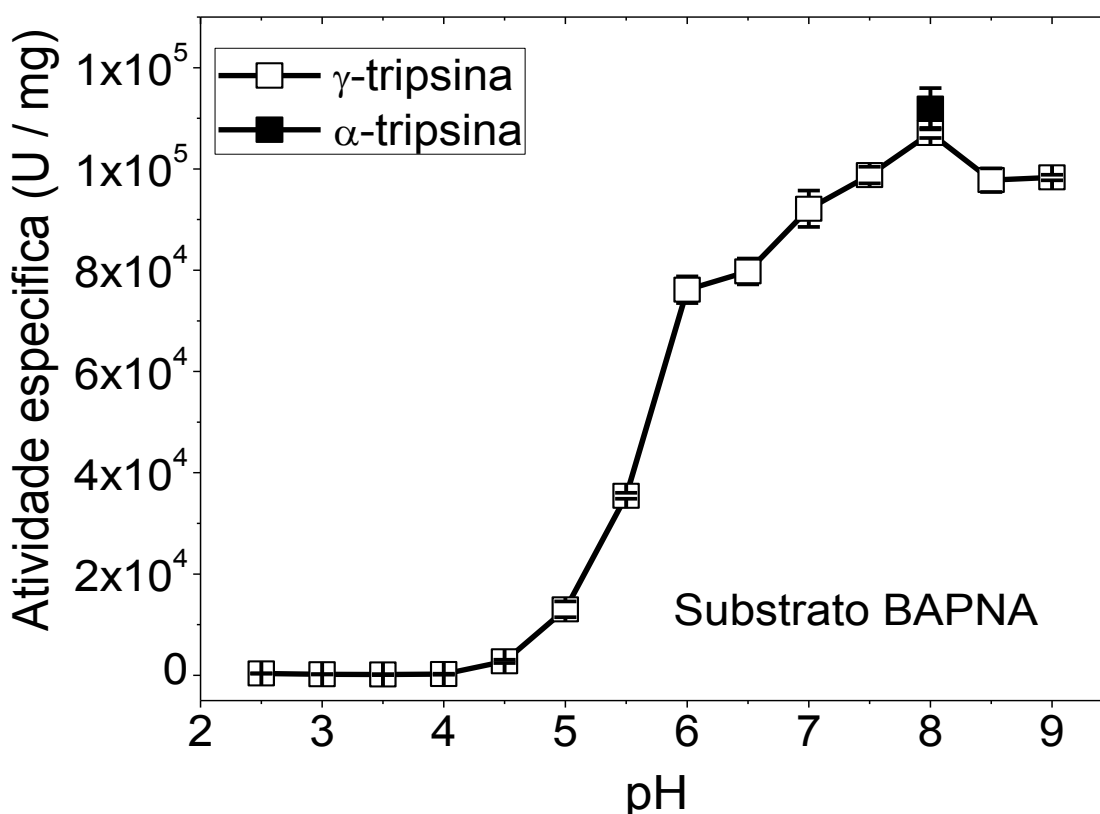


Figura 13: Atividade amidásica da isoforma γ -tripsina em função do pH e da α -tripsina em pH 8,0 usando o substrato BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.

Quando as primeiras pesquisas sobre as isoformas de tripsina iniciaram-se no ano de 1970 era muito comum a realização de testes de atividade esterásica, visto que as serino proteases apresentam secundariamente esta atividade (FOUCAULT; SEYDOUX; YON, 1974; SMITH; SHAW, 1969), assim para efeitos de comparação realizamos esta medida de atividade. Como pode ser observado na Figura 14 o perfil esterásico de γ - e α -tripsina em diferentes valores de pH mostrou-se diferente do observado em relação à atividade amidásica (Figura 13) para a mesma faixa de pH analisado. O perfil de atividade apresentou um aumento de pH 2,5 a 5, em pH 5 atingiu sua máxima atividade diminuindo em seguida, depois diminui a atividade de pH 5,5 a 7 e acima de pH 7,5 teve um leve aumento até pH 9. A γ - e a α -tripsina apresentaram o mesmo perfil de catalise para substrato éster, porém a isoforma γ -tripsina catalisou uma quantidade maior de substrato, levando a formação de mais produto durante um mesmo período em comparação com a α -tripsina, apresentando uma eficiência catalítica maior para o substrato do que a isoforma α -tripsina.

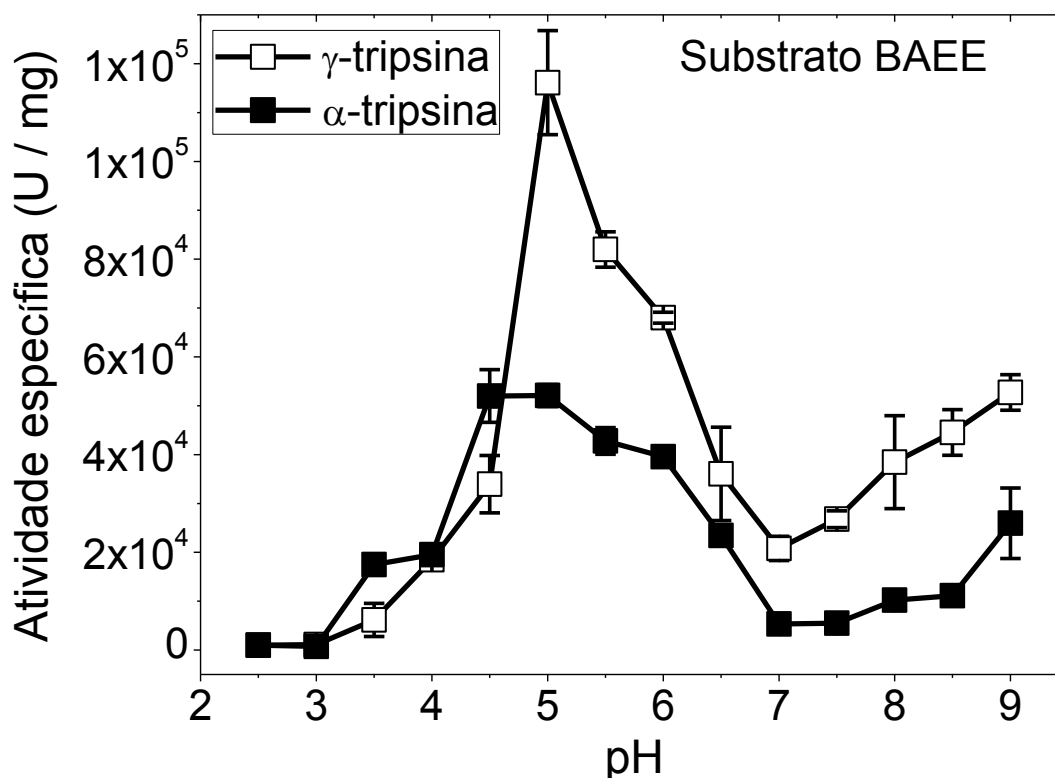


Figura 14: Atividade esterásica das isoformas γ - e α -tripsina em função do pH usando como substrato o BAEE. O cromóforo foi detectado a 253 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.

De forma geral a atividade das enzimas γ - e α -tripsina em pH 8,0 mostraram-se melhores catalisadoras para o substrato amida do que para o substrato éster. Em relação à atividade amidásica o pH ótimo foi 8 e para esterásica foi pH 5 para ambas as isoformas. Esta confirmação é interessante, pois o valor de pH 8 corresponde com a ação biológica da tripsina, pois a mesma é secreta pelo pâncreas na forma inativa e somente no intestino (que possui pH em torno de 8) é convertido na forma ativa com atividade proteolítica (BODE; FEHLHAMMER; HUBER, 1976). Como sua função fisiológica está relacionada com a clivagem de ligação peptídica, ou seja, um grupamento amida justifica o fato de ter sido observado maior atividade amidásica do que esterásica para ambas isoformas em pH 8,0. Porém, ambas isoformas, mostraram-se boas catalisadoras de substratos éster em pH 5,0; o que não está relacionado com sua principal função fisiológica, porém essa atividade pode ser explorada para fins em que se deseja atividade esterásica, por exemplo na biocatálise de reações orgânicas. Apesar das duas isoformas apresentarem essa característica a isoforma γ -tripsina apresentou maior intensidade de catálise esterásica (Figura 14) do que α -tripsina, sendo que em pH 5 a γ -tripsina apresentou atividade específica 2,23 vezes maior do que da α -tripsina e em pH 8 3,77 vezes maior.

6.3.2 Avaliação da atividade enzimática amidásica e esterásica em função da adição de Cloreto de Cálcio para as isoformas γ - e α -tripsina

O efeito dos íons metálicos sobre a atividade das isoformas de tripsina é bem conhecido e estudado para outras isoformas, e este efeito pode variar conforme a isoforma estudada (ABBOTT et al., 1975; BODE; SCHAWAGER, 1975; CHIANCONE et al., 1985). A fim de avaliar a atividade da nova enzima foram realizados testes da atividade amidásica e esterásica em função da concentração de cloreto de cálcio.

Na Figura 15 foi possível monitorar o comportamento da atividade amidásica de γ - e α -tripsina, em pH 8,0, frente a adição de diferentes concentrações de CaCl_2 ,

enquanto a Figura 16 mostra o comportamento nessas condições em relação a atividade esterásica.

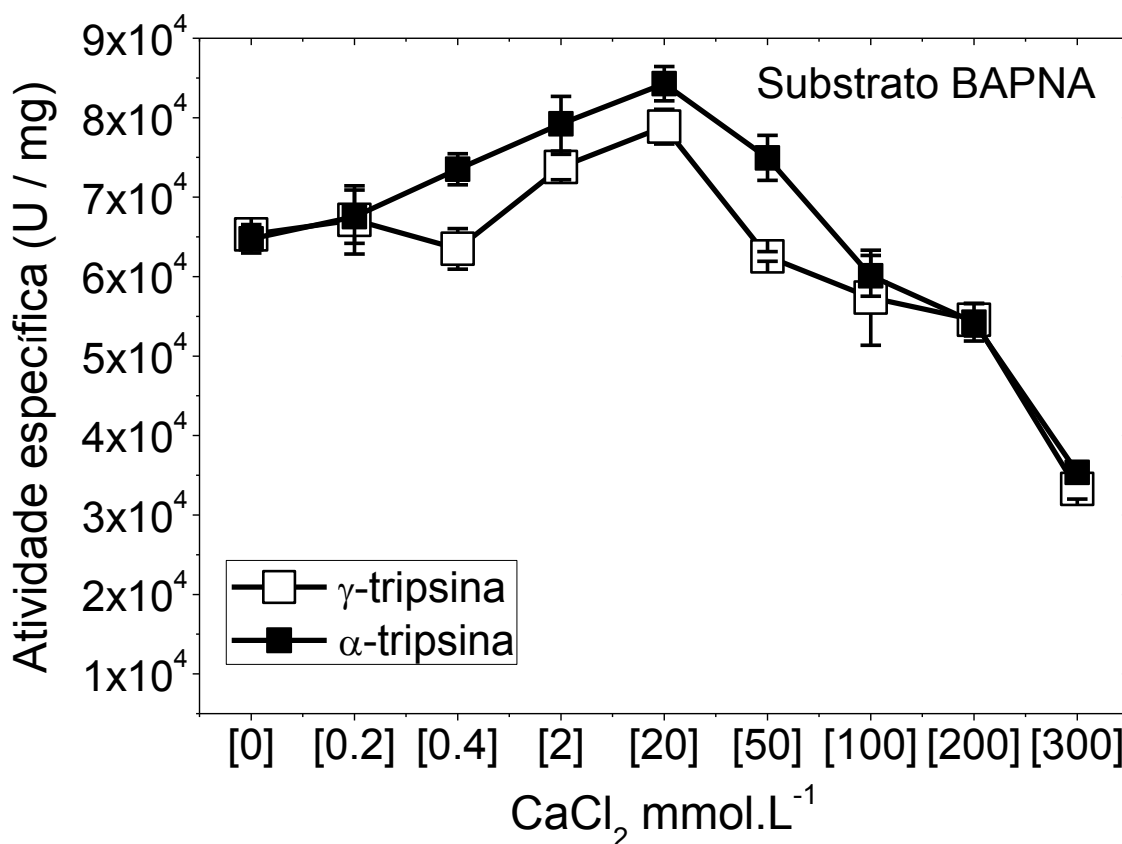


Figura 15: Atividade amidásica das isoformas γ - e α -tripsina, em função da adição de diferentes concentrações de CaCl_2 , em tampão Tris-HCl $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 8,0 usando como substrato o BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média ($n=3$) e mais ou menos um desvio padrão.

A análise dos perfis de atividade na Figura 15 e na Figura 16 mostra que ambas as enzimas apresentaram perfis catalíticos semelhantes. No que se refere à atividade amidásica foi observado um aumento de atividade específica até a adição de $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de CaCl_2 e acima desta concentração a atividade começa a diminuir (Figura 15), já para atividade esterásica esse máximo de atividade específica foi observado com a adição de 2 mmol.L^{-1} de CaCl_2 (Figura 16).

Uma explicação molecular para o comportamento das enzimas frente à variação na concentração de CaCl_2 é que o aumento inicial da atividade enzimática observado na Figura 15 e na Figura 16, pode ser justificado por uma diminuição na

taxa de autólise da isoforma, assim, diminuindo a formação de isoformas inativas e além disso, o cálcio ao se ligar na enzima exerce um efeito estabilizante sobre ela (ABBOTT et al., 1975). As justificativas de que o CaCl_2 aumenta a atividade enzimática, diminui a autólise e aumenta a estabilidade da enzima vem dos primórdios das pesquisas com tripsina, onde tipicamente se adicionam CaCl_2 principalmente na concentração de $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ (BIER; NORD, 1951; GORINI, 1951; NORD; BIER, 1953).

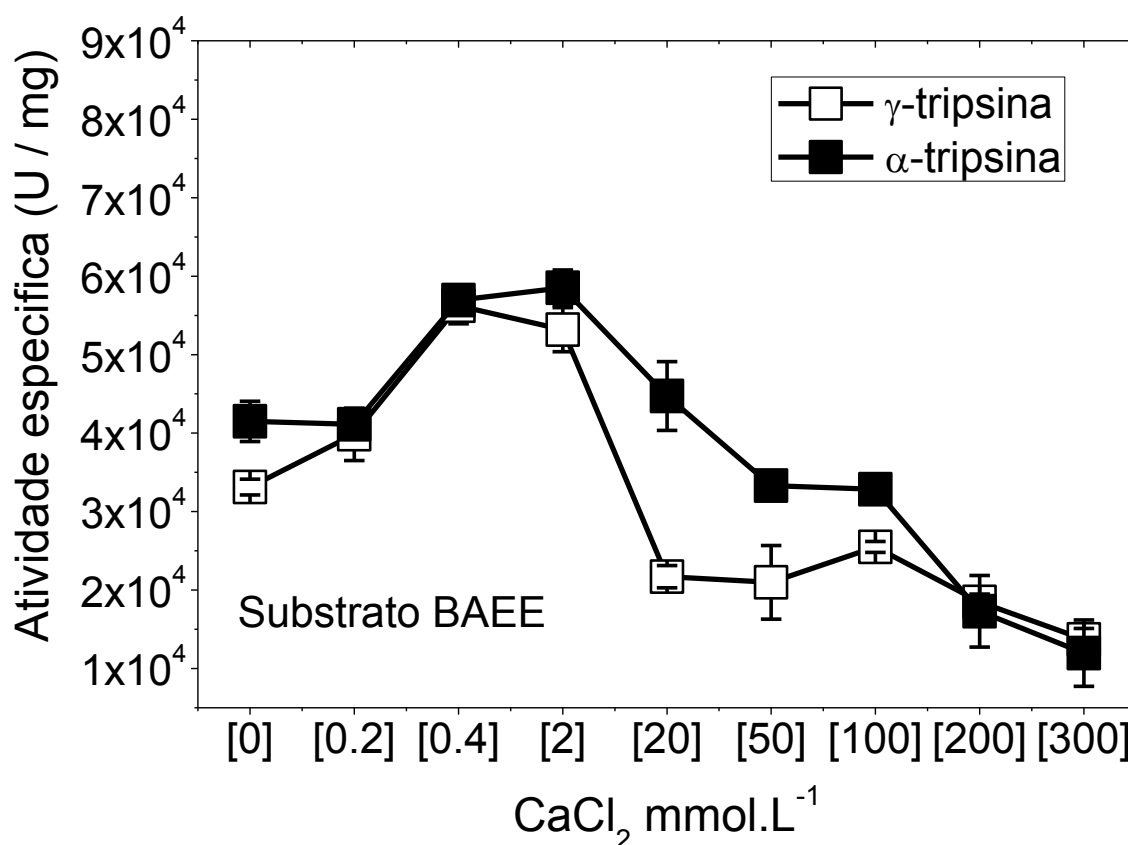


Figura 16: Atividade esterásica das isoformas γ - e α -tripsina em função da adição de CaCl_2 , em tampão Tris-HCl $50,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 8,0, usando como substrato o BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média ($n=3$) e mais ou menos um desvio padrão.

Além da teoria citada acima para justificar o aumento da atividade das enzimas frente a adição de cálcio, uma outra pode ser aventada e já explorada por trabalhos clássicos com de (LAZDUNSKI; DELAAGE, 1965) que sugerem que quando a molécula de cálcio se liga ao seu sítio ocorre uma mudança

conformacional tornando a proteína menos susceptível a autólise. Essa mudança conformacional gera uma molécula mais compacta e mais estável.

No que se refere à diminuição da atividade amidásica e esterásica após o máximo de atividade, para ambas enzimas, uma das possíveis explicações é que esse aumento pode favorecer a desnaturação e ou agregação das moléculas proteicas e assim a proteína desnaturada é melhor substrato de autólise do que a nativa. Deste modo, durante o teste de atividade o número de moléculas ativas diminuiria significativamente.

A hipótese de que ocorre agregação de proteínas é sustentada pela teoria da série de Hofmeister (LEBERMAN, 1991). A explicação para este efeito é baseada na serie de Hofmeister (Figura 17), onde pode se notar que ambos os íons Ca^{2+} e Cl^- são desestabilizantes, porém a concentração do íon necessária para exercer esse efeito é variável, dependendo das características de cada proteína.

Um dos efeitos destes íons desestabilizantes (caotrópicos) é promover a desnaturação proteica a partir de determinada concentração. Estes íons interagem preferencialmente com a proteína fazendo com que seja exposta uma maior área interfacial entre proteína-solução que é energeticamente mais desfavorável (proteína desnaturada). Assim o sistema proteína-solução-íons tende a alcançar um estado energético de menor energia para poder se estabilizar e uma das saídas para poder deixar de expor seu “core” hidrofóbico na superfície é conjugar-se com outra proteína.

Este efeito já bem conhecido aumenta a entropia do sistema diminuindo assim a tensão criada pela exposição do “core” hidrofóbico, porém as proteínas se agregam. Esta pode ser uma possível explicação para o efeito observado, diminuição de atividade enzimática com aumento da concentração destes íons.

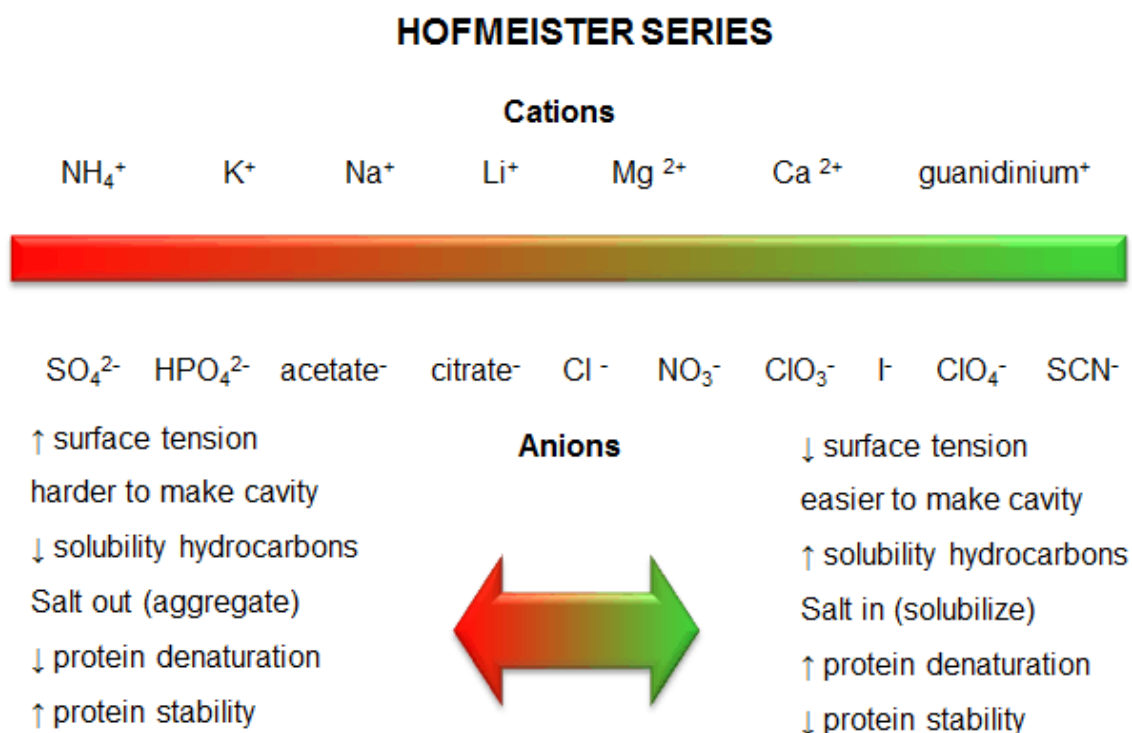


Figura 17: Série de Hofmeister,(JAKUBOWSKI, 2013).

Apesar do CaCl₂ estabilizar ou aumentar a atividade das enzimas estudadas o mesmo é um sal com íons com característica caotrópicas, ou seja, íons que tem forte interação com proteínas desestabilizando-as. Em concentrações mais baixas os íons Ca²⁺ estariam se ligando preferencialmente ao sitio de cálcio que esta proteína possui levando a uma conformação mais estável ou diminuindo a taxa de autólise como descrito por Lazdunski; Delaage, 1965, porém com aumento da concentração destes íons a relação cálcio/sitio aumenta e assim o efeito caotrópico passa a predominar.

6.3.3 Avaliação da atividade amidásica em função da adição de cloreto de sódio para as isoformas γ - e α -tripsina

A avaliação do item 6.3.2. demonstrou que a atividade das isoformas γ - e α -tripsina variam em função da adição de CaCl₂ e não somente do íon cálcio. Assim, para confirmação do efeito estabilizante do Ca²⁺, tornou-se necessário a medida da

atividade das isoformas γ - e α -tripsina em função da adição de NaCl. Na Figura 18 é possível observar a influência da adição de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade amidásica de γ - e α -tripsina em pH 8,0. Ambas isoformas mostraram o mesmo perfil, mantendo a atividade estável até a adição de 50 mmol.L⁻¹ de NaCl e em concentrações maiores o incremento de sal leva ao decréscimo de atividade amidásica. O fato de neste experimento com NaCl ter sido observado inicialmente um platô na atividade específica de ambas isoformas reforça a explicação de que o aumento inicial da atividade específica observado no experimento anterior, com adição de CaCl₂, ser devido a presença do íon cálcio, pois o cloro estava presente em ambos experimentos.

O efeito de diminuição da atividade específica com o aumento da adição de maiores concentrações de NaCl se explica da mesma forma em que foi explicado anteriormente sobre a influência do CaCl₂ sobre as isoformas em estudo, ou seja, através da teoria da serie de Hofmeister (LEBERMAN, 1991). Observando a Figura 17 constata-se o Cl⁻ esta na área de transição entre agentes estabilizantes e os desestabilizantes, enquanto Na⁺ esta na mais deslocado para área de estabilizantes. Isso poderia explicar o fato da γ - e da α -tripsina se manterem estáveis até concentrações maiores de NaCl do que de CaCl₂. Segundo a teoria de Hofmeister existe uma concentração mínima e específica para cada molécula para que estes íons possam agir como agente caotrópico. Para as isoformas estudadas neste trabalho este efeito foi observado em concentrações acima de 50,0 mmol.L⁻¹ de NaCl.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

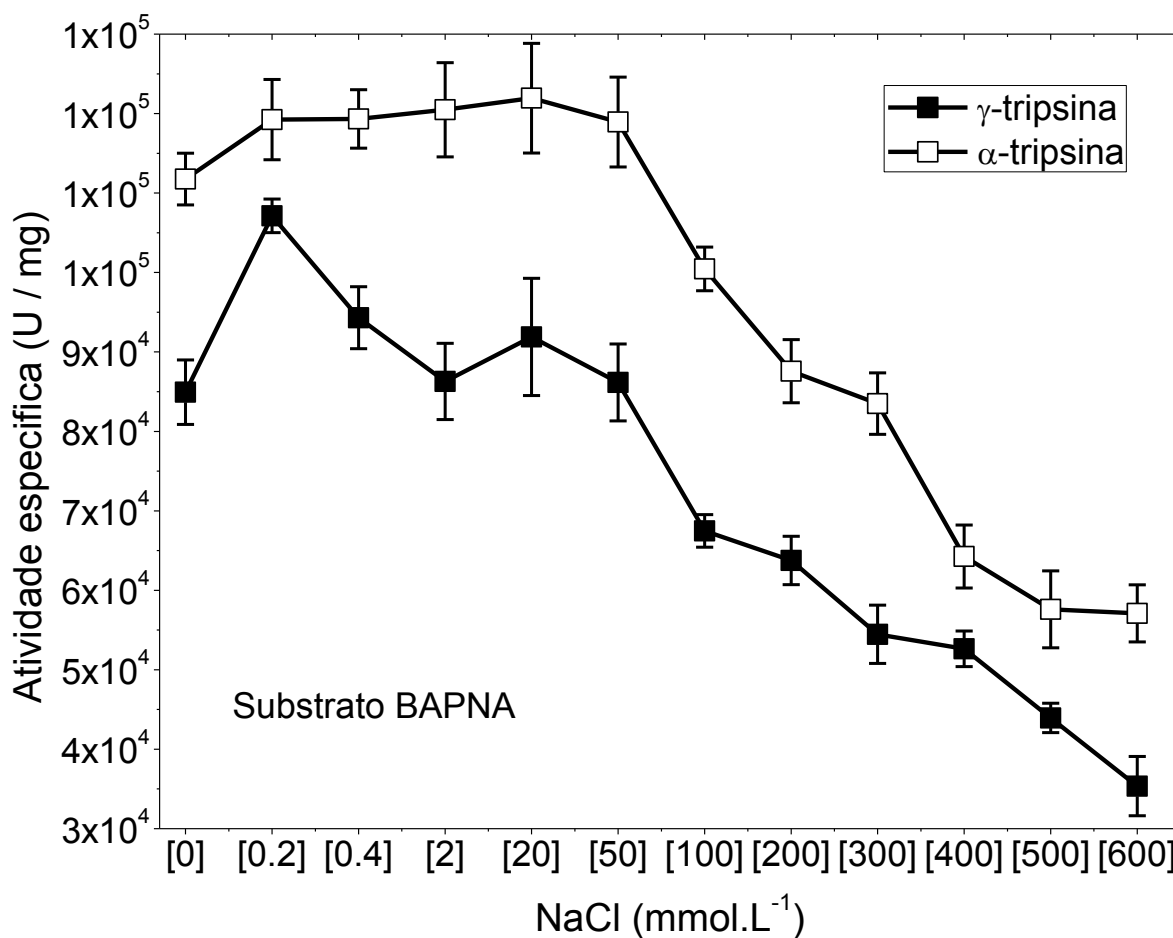


Figura 18: Atividade amidásica das isoformas γ - e α -tripsina em função da adição de NaCl, em tampão Tris-HCl 100,0 mmol.L⁻¹, pH 8,0, usando como substrato o BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.

Outra observação interessante contida na Figura 18 é que γ -tripsina se mostrou mais sensível, do que α -tripsina, à presença dos íons Cl⁻ e Na⁺, uma vez que em toda faixa avaliada apresentou atividade específica menor. Isto ocorre provavelmente porque a γ -tripsina tem uma carga superficial inferior a da α -tripsina (Tabela 2), assim, provavelmente possuindo menos pontes salinas para serem rompidas.

6.3.4 Perfil de estabilidade térmica em função do tempo e temperatura para as isoformas γ - e α -tripsina

A determinação da termoestabilidade das isoformas de tripsina foi monitorada pela avaliação do decréscimo da atividade amidásica em função do tempo e temperatura. Como pode ser notado na Figura 19 o fator temperatura atua sobre as reações enzimáticas através de dois eventos simultâneos. O primeiro evento é caracterizado pelo aumento na velocidade da reação catalisada em resposta ao aumento da temperatura do sistema. Tanto para γ - como para a α -tripsina esse efeito foi observado até 328,15 K (Figura 19). Isto ocorre devido à elevação da temperatura provocar o aumento da energia cinética média das moléculas componentes do sistema. Já no segundo evento, temperaturas mais altas levam à desnaturação enzimática por alterarem as interações fracas que conservam a estrutura tridimensional da enzima, devido ao aumento das vibrações intermoleculares (KUMAR; VENKATESU, 2012). Após o rompimento destas interações a conformação tridimensional se altera de maneira que leva a perda de atividade enzimática. Então, com menos moléculas na forma nativa, ou seja, capazes de realizar a hidrólise do substrato, a resposta observada da reação catalítica diminui em pelo menos 50% da atividade, fato observado em temperaturas acima de 338,15 K, para γ - e α -tripsina (Figura 19).

Nas temperaturas entre 298,15 e 328,15 K, rapidamente as curvas atingem seu ponto máximo e mantêm-se em um platô (Figura 19), o que mostra que a maioria das enzimas presentes na solução estava na forma nativa e prontamente capaz de catalisar o substrato. Porém acima de 338,15 K além da resposta catalítica ser menor a curva demora mais tempo para atingir seu platô, isso ocorre por que neste momento uma porcentagem maior que 50% das enzimas estão na forma desnaturada (considerando que o T_m da enzima é de 328,15 K), assim restaram poucas enzimas nativas capazes que catalisar a reação.

A γ -tripsina mostrou atividade semelhante a α -tripsina, o que sugere que ambas possuam T_m próximos, pois atingiram o máximo de atividade catalítica na mesma temperatura e também perderam a atividade na mesma temperatura e na mesma proporção. A α -tripsina possui T_m igual a 325,9 K (SANTOS et al., 2008b),

RESULTADOS E DISCUSSÃO

dessa forma esperamos encontrar um valor semelhante a este para γ -tripsina no estudo termodinâmico. Uma vez que no T_m , ou seja, 50% das proteínas passam para o estado desnaturado, em temperaturas acima do T_m a atividade catalítica diminui acentuadamente.

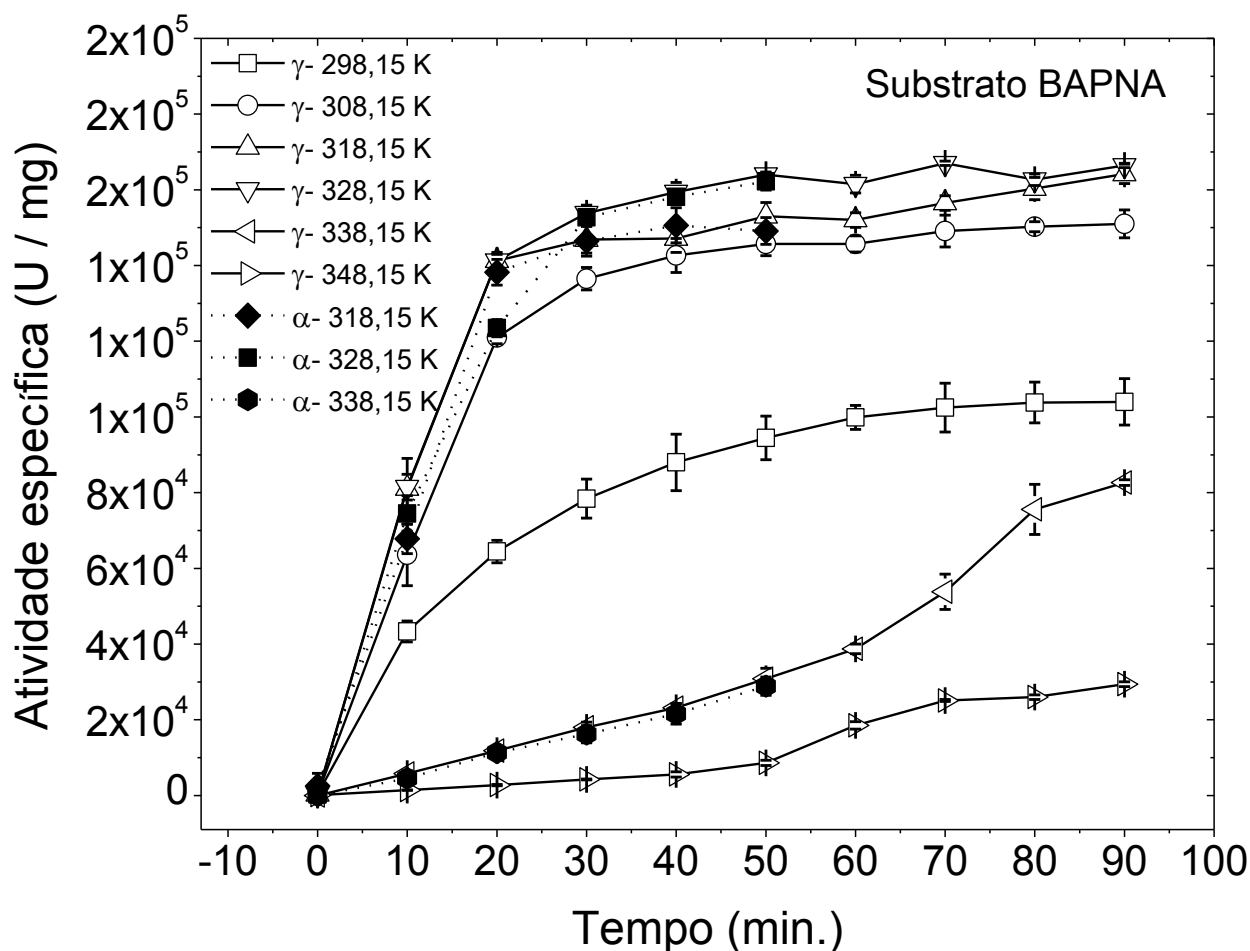


Figura 19: Atividade amidásica das isoformas γ - e α -tripsina em diferentes temperaturas em função do tempo, para γ -tripsina foi feito de 298,15 a 348,15 K (variando 10 K) durante 90 minutos (com medidas a cada 10 minutos) e para α -tripsina foi feito nas temperaturas 318,15/ 328,15/ e 338,15 K durante 50 minutos (com medidas a cada 10 minutos), em tampão Tris-HCl 50,0 mmol.L⁻¹, pH 8,0 contendo CaCl₂ a 20,0 mmol.L⁻¹ usando como substrato o BAPNA. O cromóforo foi detectado a 410 nm. Os valores são expressos como média (n=3) e mais ou menos um desvio padrão.

6.4 Dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular foi utilizada tanto para determinar a composição da estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina como para o estudo de estabilidade térmica de γ -tripsina. Os experimentos foram realizados em pH 3 e este valor foi escolhido, devido neste meio a taxa de autólise ser menor garantindo que o resultado obtido fosse resposta de uma única isoforma e não de uma mistura. Para que o estudo fosse realizado em meios alcalinos seria preciso adicionar uma molécula inibidora, o que não seria adequado para o estudo, visto que a ligação desta molécula levaria a uma possível alteração da conformação original da proteína, ou mesmo a mudança do sistema termodinâmico.

6.4.1 Determinação da estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina

A composição da estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina foi determinada em pH 3,0 a 25 °C. Os espectros obtidos foram analisados utilizando o algoritmo e banco de dados CDSSTR[®] (JOHNSON, 1999) acessado pelo DICHROWEB para quantificar as estruturas secundárias que compõe cada isoforma, este algoritmo foi escolhido, pois foi o que melhor se ajustou às características dos dados deste trabalho, uma vez que o NRMSD (raiz quadrada do desvio médio normalizado) obtido foi menor que 0,1, sendo este um dos principais critérios para confirmar que os valores da predição estão corretos (WHITMORE; WALLACE, 2004). Os dados obtidos por esta análise estão contidos na Tabela 1.

Ambas isoformas apresentaram perfil espectral semelhante com mínimos na mesma região (Figura 20). Através dos dados obtidos e descritos na Tabela 1 é possível perceber que ambas isoformas possuem porcentagem semelhante de cada tipo de estrutura secundária determinada. Mostrando com isso que independente da região onde ocorreu a clivagem para originar cada uma das isoformas estudadas a molécula se rearranjou de tal forma que elas ficaram com porcentagem de estrutura secundária similar. Os valores observados neste experimento para isoforma α -

tripsina estão de acordo com valores relatados anteriormente por (MARTINS, 1998) para essa isoforma, os dados estão mostrados na Tabela 1 confirmando a exatidão de nossos dados.

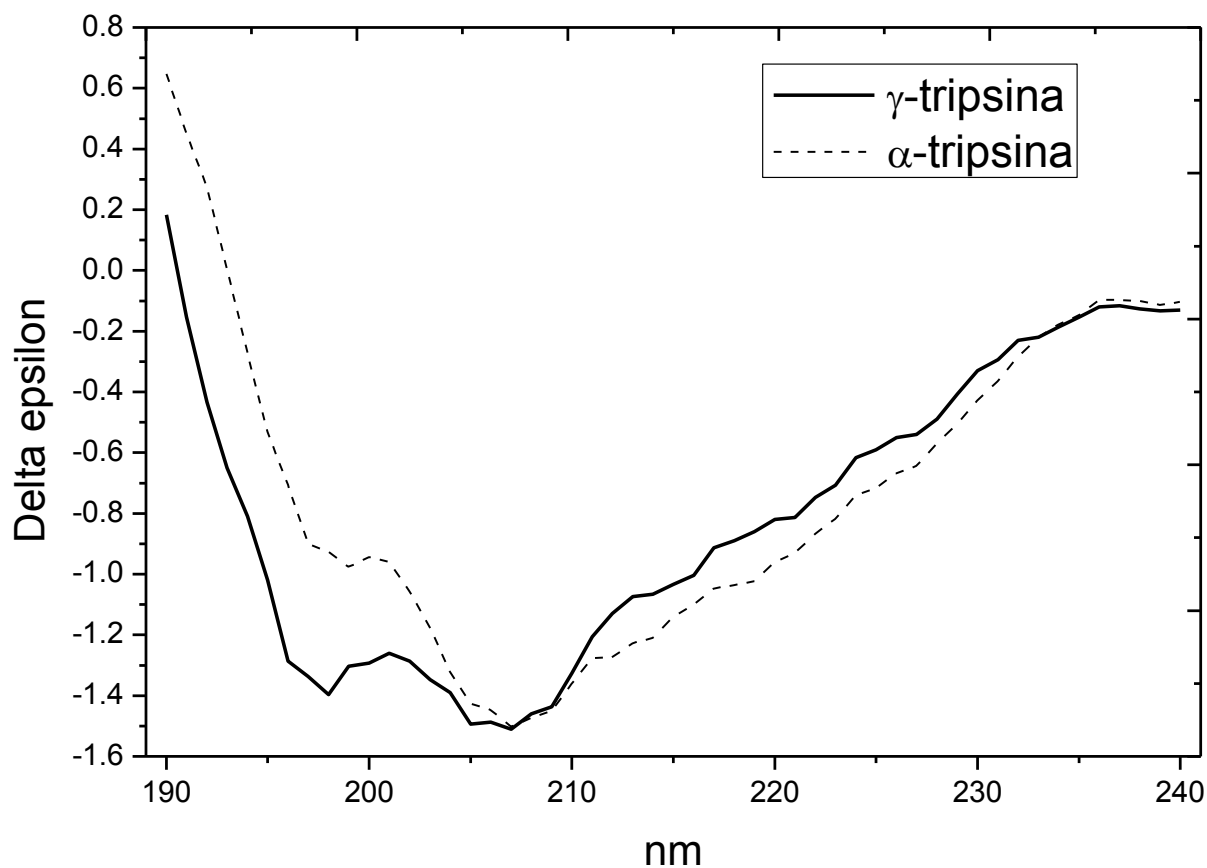


Figura 20: Espectro de dicroísmo circular das isoformas γ - e α -tripsina, em tampão fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L⁻¹, pH 3,0 a 298,15 K, para determinação da composição de estrutura secundária.

Tabela 1: Composição em estrutura secundária das isoformas γ - e α -tripsina, em pH 3,0, obtida através do espectro de dicroísmo circular, analisado pelo software CDSSTR[®].

Isoforma	Alfa hélice (%)	Folha beta (%)	Random coil (%)
γ -tripsina	7,3	35,0	57,3
α -tripsina	7,3	35,3	56,3
α -tripsina*	8	36	56

*Experimento realizado por (MARTINS, 1998).

6.5 Volume hidrodinâmico das isoformas γ - e α -tripsina em pH 3,0

A fim de realizar inferências sobre os volumes hidrodinâmicos das isoformas foi realizada cromatografia de exclusão molecular, separadamente, para as isoformas γ - e α -tripsina provenientes do processo de purificação e estes resultados podem ser vistos na Figura 21, bem como os valores de volume hidrodinâmico calculados a partir do raio hidrodinâmico que foram obtidos através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Como pode ser observado na Figura 21 os volumes de retenção na cromatografia de exclusão molecular de ambas isoformas foram semelhantes e uma vez que este tipo de cromatografia se baseia na separação por volume das moléculas é possível afirmar que as isoformas analisadas possuem tamanhos semelhantes. O resultado qualitativo de volume hidrodinâmico foi validado pela realização da técnica de DLS e estes resultados podem ser vistos na Figura 21, onde os valores não foram significativamente diferentes para as duas isoformas. Ambos os resultados sugerem que após o processo de formação das isoformas γ - e α -tripsina a partir da isoforma β -tripsina, ambas as enzimas sofrem ajustes conformacionais de modo a alcançarem uma forma mais estável e esta estrutura final das duas isoformas não possuem diferenças significativas levando em conta sua forma globular.

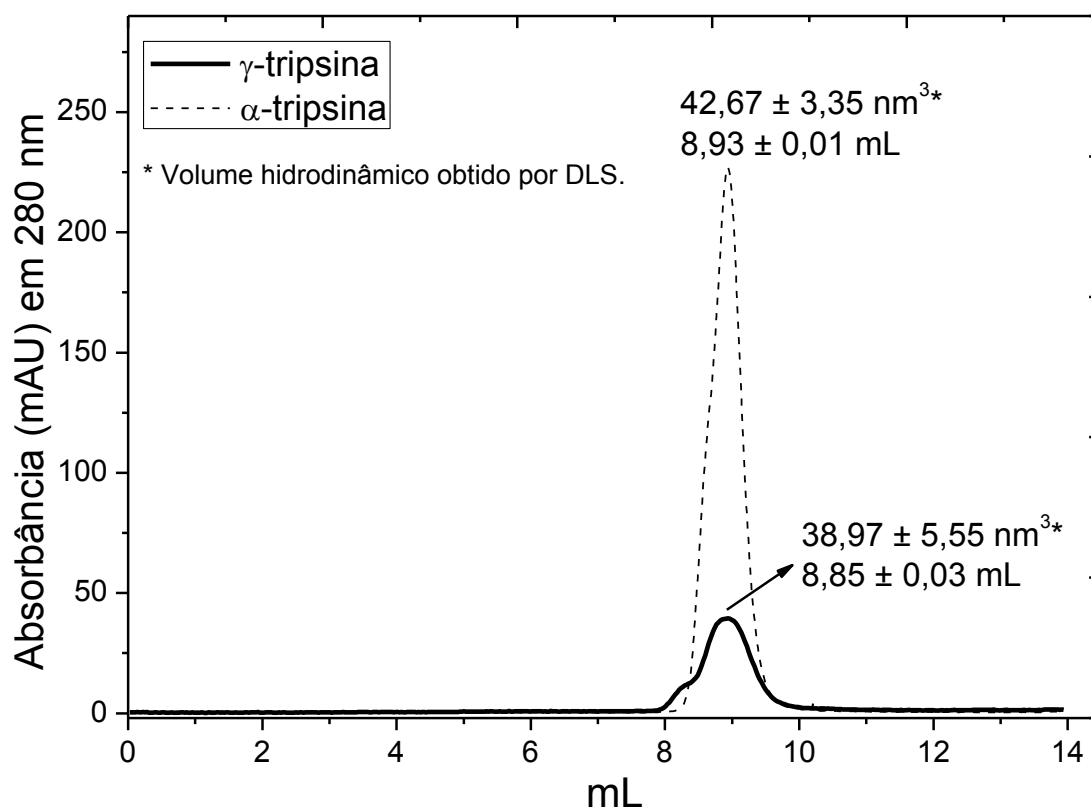


Figura 21: Sobreposição dos cromatogramas das isoformas γ - e α -tripsina obtidos por cromatografia de exclusão molecular, utilizando como fase móvel tampão glicina a $100,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 3,0, contendo CaCl_2 a $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ eluindo em fluxo de $800 \mu\text{L.min}^{-1}$ a 25°C , com injeção manual de $100 \mu\text{L}$ de uma solução a $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$, e a absorção do eluato foi monitorada a 280 nm. E os volumes hidrodinâmicos de γ - e α -tripsina obtidos pela técnica de DLS, em tampão fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH 3,0 a 25°C .

6.6 Potencial zeta, carga superficial e fator de retenção k das isoformas γ - e α -tripsina em pH 3,0

Com intuito de tentar diferenciar as isoformas γ - e α -tripsina foram estudadas as propriedades físicas como potencial zeta, carga superficial e fator de retenção K.

Tanto o perfil cromatográfico observado na Figura 10, como a diferença de resposta catalítica frente à presença de íons (Figura 15, Figura 16 e Figura 18) sugere que a γ - e α -tripsina possuem diferentes distribuições de resíduos de aminoácidos carregados na superfície da molécula e os resultados descritos na Tabela 2 confirmam essa suposição.

Tabela 2: Potencial zeta, carga superficial e fator de retenção k, de γ - e α -tripsina em pH 3,0

Isoforma	Potencial zeta ¹	Carga superficial ²	Fator de retenção ³
γ -tripsina	0,650 \pm 0,001	1	1,299
α -tripsina	0,660 \pm 0,001	5,66	3,029

¹ Obtido por mobilidade eletroforética

² Obtido por mobilidade eletroforética e o valor representa o quanto a carga superficial de uma isoforma é maior que a outra.

³ Obtido por cálculo (PASCHOAL et al., 2008) a partir do cromatograma da Figura 10.

Como pode ser observado na Tabela 2 a γ -tripsina apresentou fator de retenção k aproximadamente 2 vezes menor em relação à α -tripsina. Considerando que esse resultado é relativo a uma cromatografia de troca iônica isto significa que a γ -tripsina fica menos retida na coluna, ou seja, interage mais fracamente com a fase estacionária do que a α -tripsina, deste modo eluida primeiro. Além disto o fato da γ -tripsina apresentar carga superficial e potencial zeta menor do que a α -tripsina (Tabela 2), justifica o resultado do perfil cromatográfico.

6.7 Estabilidade térmica

6.7.1 Espectroscopia ultravioleta

A fim de explorar as propriedades de enovelamento/desenovelamento das isoformas de tripsina, inicialmente optou-se por monitorar a estabilidade térmica por espectroscopia no ultravioleta. Essa técnica monitora o deslocamento dos resíduos de aminoácidos aromáticos, Phe, Tir e Trp, do interior (hidrofóbico ou com pouca quantidade de água) para o exterior da molécula (polar ou com maior quantidade de água), e como os aminoácidos citados acima tem uma tendência a ficar no interior

da molécula, quando uma proteína esta em processo de desnaturação, os mesmos são expostos ao solvente, o que gera uma mudança no espectro de absorção na faixa do ultra violeta de 260 a 310 nm.

Durante a padronização do método a menor concentração que possibilitou a aquisição de dados confiáveis foi de $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$, pois mesmo após o processo de desnaturação, que leva a diminuição da absorção por parte dos resíduos aminoácidos Phe, Tyr e Trp, o valor da absorção permaneceu acima do valor do limite de quantificação ($10 \times \text{Sinal /Ruido}$). A varredura na faixa de 260 a 310 nm foi utilizada por ser faixa de maior absorção dos resíduos de aminoácidos monitorados (Phe, Tyr e Trp). A resolução e passo de 1 nm e a velocidade de varredura de 600 nm/min foi a melhor combinação que permitiu à obtenção de gráficos que refletiu melhor as mudanças ocorridas no processo de desnaturação. Este conjunto de parâmetros otimizados, possibilitou a a avaliação por análise da segunda ou quarta derivada do gráfico, bem como da mudança na intensidade da absorção.

Como todos os processos termodinâmicos devem ter um alto grau reversibilidade tornou-se imprescindível investigar se a isoforma γ -tripsina passa por um processo reversível de desnaturação. O teste reversibilidade térmica na Figura 22, mostrou que tanto a γ - como a α -tripsina sofrem um processo reversível de desnaturação, pois como pode ser observado na Figura 22 os espectros de absorção a 293,15 K obtidos antes e após o processo de desnaturação térmica (353,15 K) se sobrepõem em mais de 90% e a absorção dos resíduos de aminoácidos Tyr e Trp são >95%.

A Figura 22 mostra que experimento foi considerado satisfatório em relação a reversibilidade e a Figura 23 a obtenção de uma curva sigmoidal que equivale a uma desnaturação térmica em dois estados e estes são critérios básicos para obter parâmetros termodinâmicos a partir de dados espectroscópicos (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

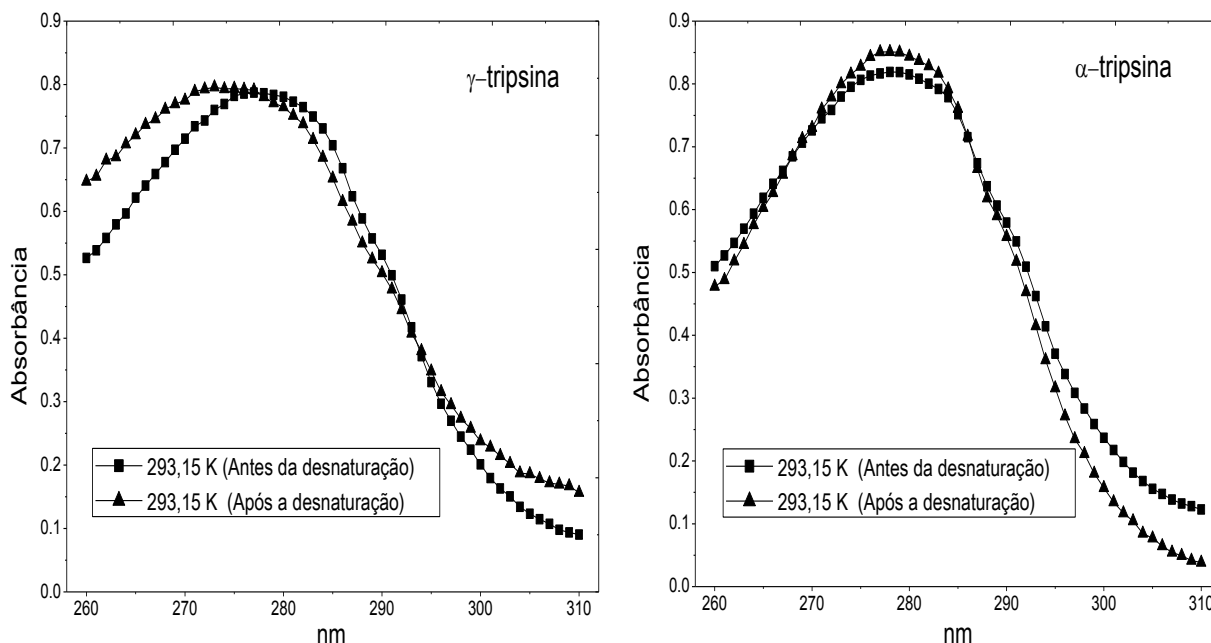


Figura 22: Teste de reversibilidade para γ - e α -tripsina durante o processo de desnaturação térmica. O espectro absorção com os símbolos quadrados foi adquirido na primeira temperatura do experimento (293,15 K), onde a proteína está no estado nativo. E o espectro com símbolos triângulos foi adquirido após a proteína ter sido desnaturada por calor (aquecida até 353,15 K) e resfriada a temperatura inicial.

A partir da análise das varreduras espectrais (260 a 310 nm) foram calculados a segunda e quarta derivada dos espectros de absorção obtidos durante a desnaturação térmica, e os dados foram analisados segundo (BALESTRIERI et al., 1978; MACH et al., 1991; PADRÓS et al., 1982; RAGONE et al., 1984), neste tipo de análise é monitorado o deslocamento dos picos referente a absorção de cada resíduo de aminoácido de uma proteína (Phe, Tyr e Trp). Porém esta técnica não foi sensível para analisar os dados obtidos para γ - e α -tripsina, pois a variação no comprimento de onda no máximo de absorção para os resíduos de aminoácidos Phe, Tyr e Trp não foi tão significativa durante o processo de desnaturação. Outra opção de análise foi monitorar a mudança na intensidade de absorção dos resíduos de Phe, Tyr e Trp das isoformas de tripsina em função do aumento da temperatura (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990). Esta análise mostrou-se eficaz em relação a sensibilidade e precisão dos resultados termodinâmicos, e assim foi utilizada para obter os parâmetros termodinâmicos das isoformas γ - e α -tripsina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de determinar a exatidão desta técnica foi realizado um experimento empregando-se a isoforma α -tripsina para obtenção dos valores de T_m e ΔH . Os valores de T_m e ΔH obtidos para α -tripsina (Figura 23) pela técnica de acompanhamento de desnaturação da enzima por UV, foram próximos ao descrito na literatura (325,9 K, SANTOS et al., 2008b), mas não iguais sendo que o T_m apresentou diferença de um grau centígrado. Provavelmente isso ocorreu por o espectrofotômetro utilizado não possuir um sistema de aquecimento próprio, então era necessário que as amostras fossem aquecidas em um banho externo e transferidas no momento da obtenção dos dados e durante essa transferência pode ter ocorrido troca de calor com o ambiente alterando assim a energia do sistema e o resultado real.

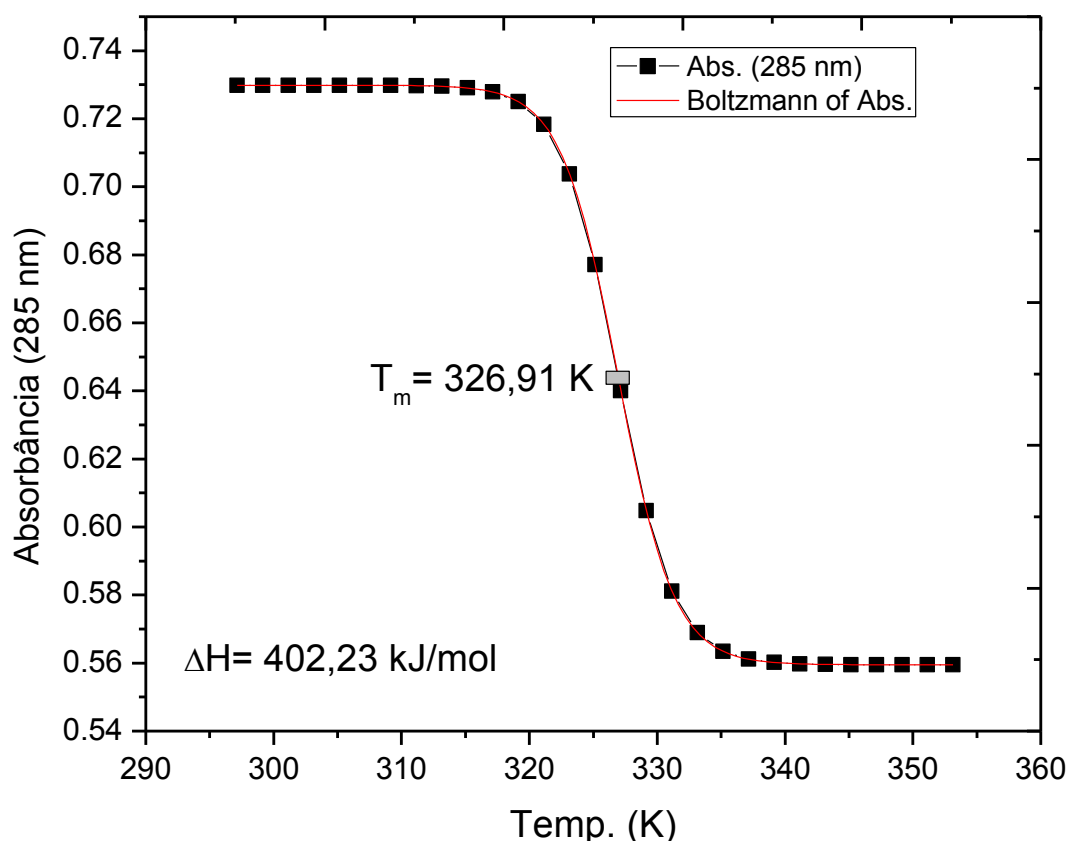


Figura 23: Curva ajustada matematicamente pela equação de Boltzmann, monitorada por espectroscopia ultravioleta 285 nm, de α -tripsina ($0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$), em tampão tampão glicina 50 mmol.L^{-1} + cloreto de cálcio 20 mmol.L^{-1} , pH 3,0, em diferentes temperaturas ($293,15\text{--}353,15 \text{ K}$). T_m é temperatura média de desnaturação e ΔH é a variação de entalpia.

Apesar da diferença de valores de T_m e ΔH obtidos na técnica padronizada por espectroscopia por UV ser extremamente pequena, para caracterização de uma nova enzima e devido as inúmeras semelhanças que este trabalho mostrou ter entre as isoformas γ - e α -tripsina, tornou-se necessário explorar as propriedades termodinâmica da enzima γ -tripsina em uma técnica mais exata. Diante desse problema optou-se por monitorar o processo de desnaturação por dicroísmo circular em equipamento acoplado com sistema peltier de controle de temperatura. Como a UFES não dispunha desse tipo de equipamento esses experimentos foram realizados no Laboratório de espectroscopia e calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) em Campinas.

6.7.2 Dicroísmo circular

A fim de monitorar o processo de desnaturação térmica da isoforma γ -tripsina com alta exatidão foi realizado um processo de desnaturação térmica monitorado por espectroscopia de dicroísmo circular. A Figura 24 mostra a curva de desnaturação térmica da isoforma γ -tripsina em pH 3,0 a 205 nm. A partir dos resultados experimentais a curva foi ajustada utilizando a equação de Boltzmann (Figura 24A) e os dados obtidos foram utilizados para cálculo dos parâmetros termodinâmicos T_m , ΔH_{T_m} and ΔS_{T_m} bem como para o cálculo índice de cooperatividade, dispostos na Tabela 3. Os dados da curva de desnaturação térmica foram normalizados entre 0 e 1 para f_U (fração desnaturada), onde 0 representa o estado 100 % nativo e 1 o estado 100 % desnaturado (Figura 24B).

A reprodutibilidade dos testes foi considerada boa (>90%) e a reversibilidade de desnaturação térmica foi de aproximadamente 95% ou mais para γ -tripsina. O sinal espectroscópico para o desdobramento da proteína (Figura 24) apresentou uma curva sigmoideal, que é típico de um processo de desnaturação proteica em dois estados monitorado através de técnicas espectroscópicas (PRIVALOV, 1979). Foram realizadas apenas algumas medidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) com γ -tripsina, para determinação da relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$, e estes resultados

estão próximos da unidade (0,98). Como a γ -tripsina apresentou alta reversibilidade térmica, desnaturação em dois estados e relação $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$ próximo de um, os resultados obtidos por técnicas espectroscópicas, podem ser utilizados para determinar os parâmetros termodinâmicos e considerar que o ΔH_{VH} calculado é igual ao ΔH_{cal} (PACE; SHIRLEY; THOMSON, 1990).

Como pode ser visto na Tabela 3, durante a desnaturação térmica em pH 3,0, monitorada por CD a 215 nm a isoforma γ -tripsina apresentou T_m e CI maior do que α -tripsina (SANTOS et al., 2008b), ΔH_{Tm} e ΔS_{Tm} menor que da α -tripsina. Portanto, a γ -tripsina mostrou ser termicamente mais estável do que a α -tripsina em pH 3,0. Além disto, a γ -tripsina apresentou uma menor variação de temperatura na área de transição durante o processo de desnaturação térmica, possuindo um maior CI do que a α -tripsina em pH 3,0.

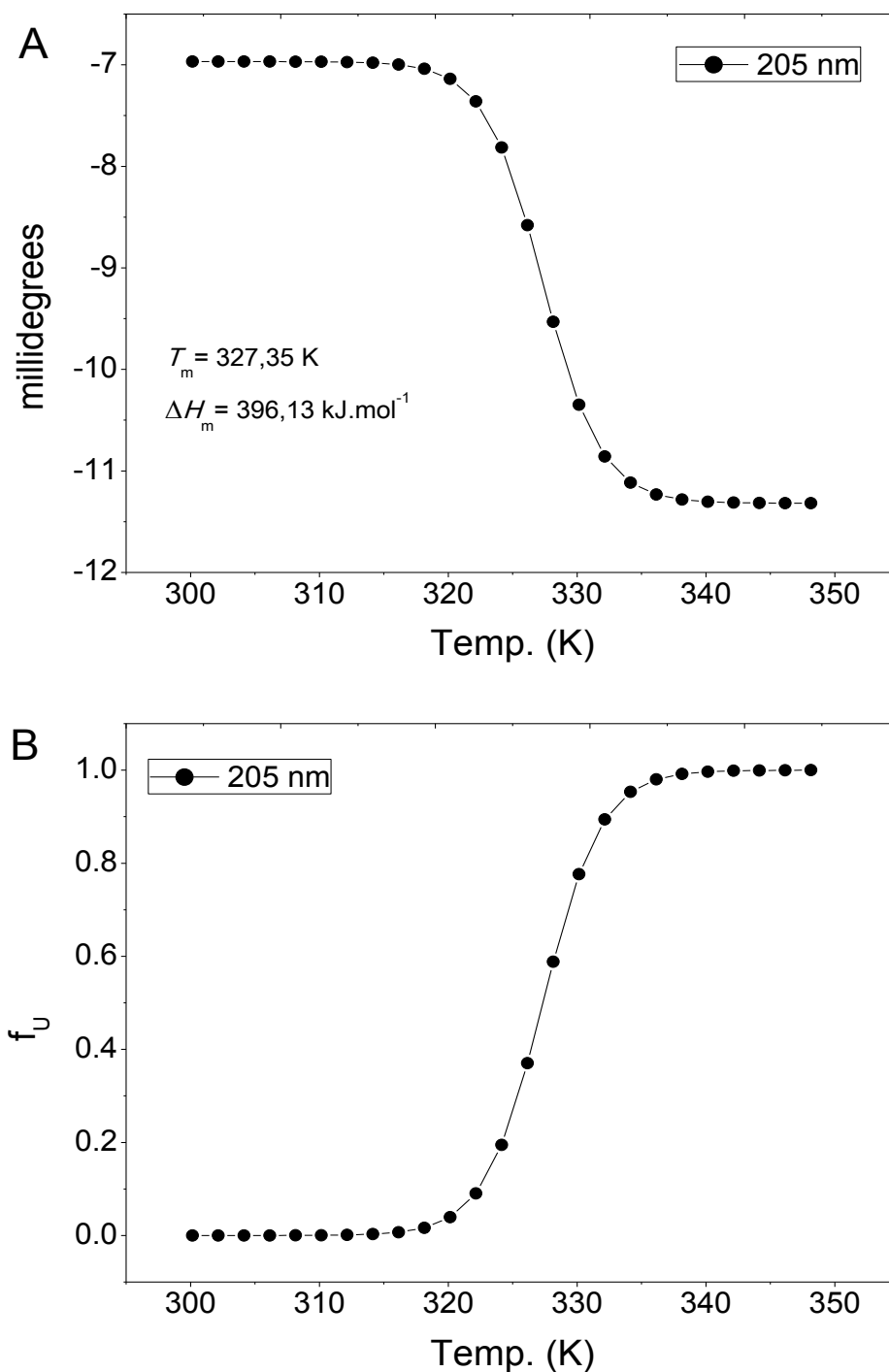


Figura 24: Curva de desnaturação térmica. (A) Curva ajustada matematicamente no modelo sigmoidal que pode ser considerado um modelo de transição de dois estados, monitorada por dicroísmo circular a 205 nm, de γ -tripsina ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$), em tampão 30 mmol.L^{-1} fosfato de sódio monobásico, pH 3,0, em diferentes temperaturas ($298,15\text{--}344,15 \text{ K}$). T_m é temperatura média de desnaturação e ΔH é a variação de entalpia (B) Curva normalizada da fração desnaturada em cada temperatura a partir dos resultados da curva A.

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos das isoformas γ - e α -tripsina em pH 3,0

Isoformas	T_m^a (K)	$\Delta H_{T_m}^b$ (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta S_{T_m}^c$ (kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	Cl^d (K)
γ -tripsina*	327,35 \pm 0,2	396,13 \pm 12	1,21 \pm 0,02	0,11
α -tripsina#	325,9 \pm 0,1	414,63 \pm 3,5	1,27 \pm 0,01	0,10

^a Temperatura em que 50% das moléculas estão no estado desnaturado.

^b Variação de entalpia no T_m .

^c Variação de entropia no T_m .

^d Índice de cooperatividade.

* Obtido por espectroscopia de dicroísmo circular.

Obtido por calorimetria diferencial de varredura, DSC (SANTOS et al., 2008b).

Assumindo que no estado desnaturado a população de moléculas das isoformas γ - e α -tripsina desnaturadas deve ser igual, pois elas são originadas da mesma molécula (β -tripsina), algumas considerações podem ser feitas sobre a capacidade calorífica da γ -tripsina. Para esta análise, a capacidade calorífica das enzimas deve ser analisada observando o estado nativo, uma vez que ΔC_p é igual à diferença entre a capacidade calorífica do estado desnaturado (resíduos hidrofóbicos menos enterrados no interior da molécula) e do estado nativo (resíduos hidrofóbicos mais enterrados). O estudo de estabilidade térmica indicou que γ -tripsina é mais estável do que a α -tripsina, no entanto, para a desnaturação total de γ -tripsina é necessária uma quantidade menor de calor (ΔH) do que para a α -tripsina. Este resultado pode ser explicado considerando que durante a desnaturação térmica a γ -tripsina transmite as informações calorimétricas de forma mais eficiente, sendo assim mais cooperativa do que α -tripsina, justificando uma menor quantidade de calor para provocar a sua desnaturação completa e esta explicação esta de acordo com os nossos resultados (Tabela 3). Estes resultados sugerem que o estado nativo de γ -tripsina tem um maior número de contatos hidrofóbicos e conseqüentemente, um núcleo hidrofóbico mais compacto (SPOLAR; RECORD, 1994) do que α -tripsina. Diante dessas considerações pode-se sugerir que a capacidade de calorífica, de γ -tripsina é maior da α -tripsina.

Uma vez que γ - e α -tripsina tem o mesmo raio hidrodinâmico e os resultados termodinâmicos mostraram que a γ -tripsina provavelmente tem um core hidrofóbico

RESULTADOS E DISCUSSÃO

mais compacto que o da α -tripsina, podemos sugerir um modelo para a compactação das isoformas de tripsina: para ambas as isoformas o raio total (R) da molécula seria composto pela soma dos raios de duas camadas, o core hidrofóbico mais interno (R1) e a camada externa ao core hidrofóbico (R2) (como esquematizado na Figura 25).

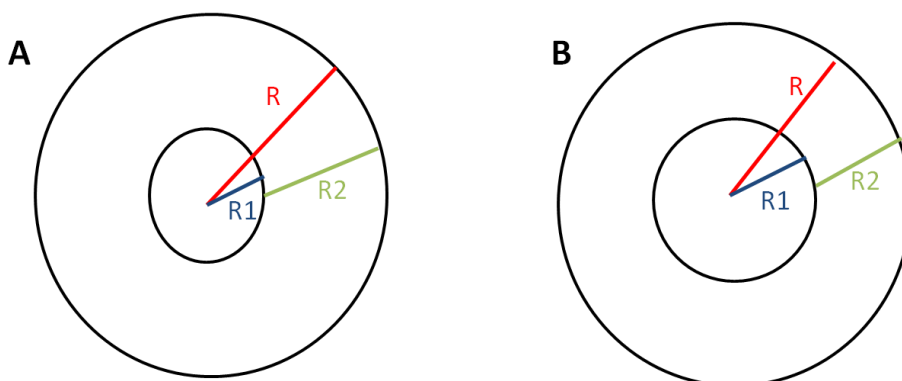


Figura 25: Representação esquemática do raio hidrodinâmico, (A) representa a γ -tripsina e (B) a α -tripsina. R é o raio total da molécula, R1 o raio da camada interna e R2 o raio da camada externa.

Assim, levando em conta nossos resultados físico-químicos de volume hidrodinâmico (raio hidrodinâmico), T_m , índice de cooperatividade e capacidade calorífica sugerida, podemos propor um modelo como na Figura 25. Sendo assim o modelo da γ -tripsina tem R1 menor do que a α -tripsina, então para que R seja igual para as duas o R2 da γ -tripsina deve ser maior do que o da α -tripsina. Dessa forma a isoforma γ -tripsina possui um volume relacionado a R1 mais compacto, com mais interações hidrofóbicas ou interações mais intensas do que no modelo para a isoforma α -tripsina.

A partir dos da caracterização realizada nesse trabalho foi possível fazer uma comparação entre γ -, α - e β -tripsina, como ilustrado na Figura 26, onde mostra que a uma clivagem na cadeia polipeptídica da β -tripsina pode originar γ - ou α -tripsina, dependendo de onde ocorra essa clivagem. Estas isoformas apresentam cargas superficiais diferentes sendo que a da β -tripsina > α -tripsina > γ -tripsina. No que se refere à estabilidade térmica e cooperatividade elas seguem a seguinte ordem: β -tripsina > γ -tripsina > α -tripsina, indicando que nessa mesma ordem o core hidrofóbico fica menos compacto, ou seja, quem é mais estável tem o core mais compacto. Como elas são da mesma família e são isoformas podemos considerar que no estado desnaturado a população de moléculas apresenta conformação muito semelhante, porém no estado nativo cada uma assume uma conformação diferente e essa diferença reflete na diferença das características estudadas.

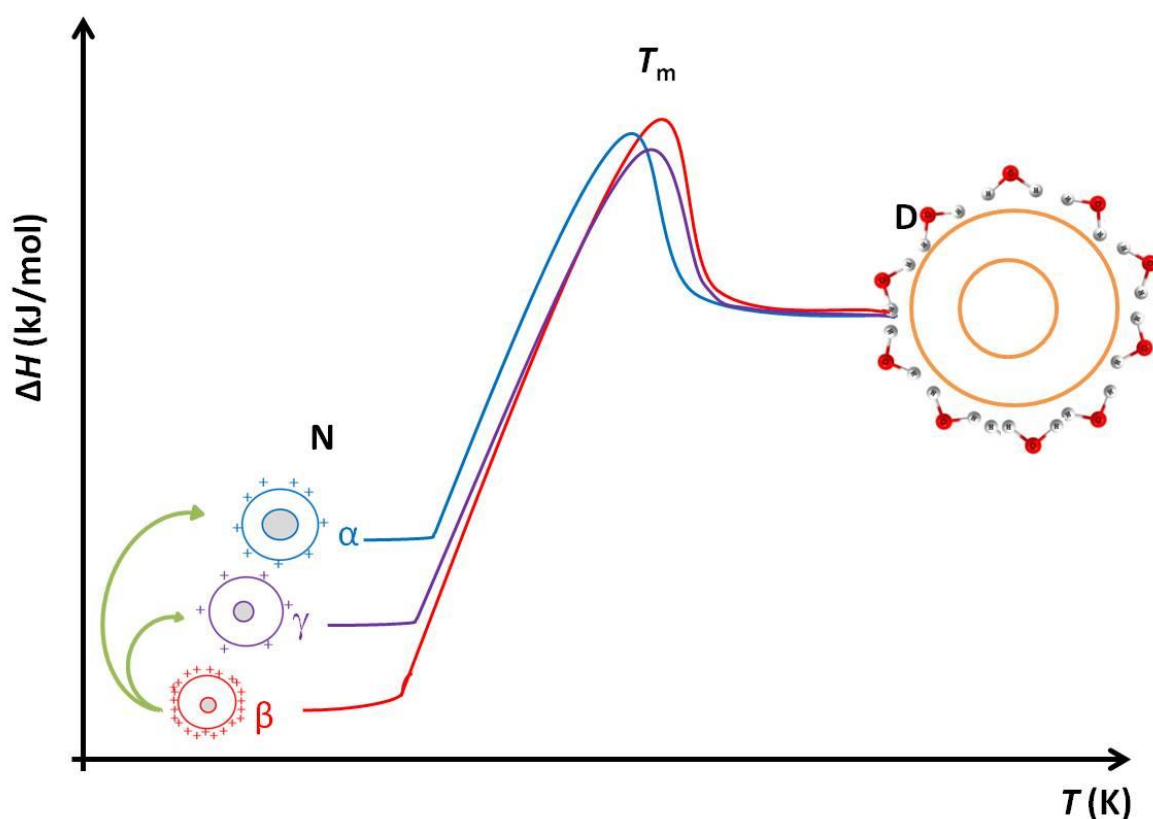


Figura 26: Resumo de alguns parâmetros físicos químicos comparativos entre γ -, α - e β -tripsina.

7 CONCLUSÃO

A isoforma, γ -tripsina, caracterizada neste trabalho é a originada da mesma isoforma (β -tripsina) e possui o mesmo número de cadeias de polipeptídicas que a α -tripsina, com diferença na posição em que ocorre a clivagem para dar sua origem. Durante a caracterização foi observado que ambas isoformas possuem a mesma massa molecular, atividades enzimáticas semelhantes, mesma composição de estrutura secundária, mesmo raio hidrodinâmico, com tantas semelhanças estruturais era esperado que elas também possuíssem propriedades termodinâmicas semelhantes. Porém isso não foi observado, os resultados mostraram que a γ -tripsina possui maior estabilidade térmica e é mais cooperativa que a α -tripsina. Estas isoformas também se mostraram diferentes quanto à distribuição de aminoácidos carregados na superfície da proteína, sendo que a γ -tripsina possui menor carga superficial que a α -tripsina.

Como a γ - e a α -tripsina apresentaram a mesma composição de estrutura secundária e o mesmo volume hidrodinâmico provavelmente elas possuem estrutura terciária diferente, uma vez que apresentam comportamento termodinâmico diferente.

Os dados da caracterização da γ -tripsina são de grande importância para estudos que visam compreender como as isoformas de tripsina são produzidas e degradadas no seu ambiente biológico. Bem como para sua aplicação como biocatalizador e na indústria farmacêutica, de alimentos e detergentes.

8 PERSPECTIVAS

Projetos futuros para a isoforma γ -tripsina:

- Cinética enzimática.
- Determinação termodinâmica completa.
- Cinética enzimática em solventes orgânicos.
- Determinação da estrutura terciária.

9 REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. et al. The location of the calcium ion binding site in bovine alpha-trypsin and beta-trypsin using lanthanide ion probes. **Biochemistry**, v. 14, n. 22, p. 4935–4943, 1975.

AHMAD, F.; YADAV, S.; TANEJA, S. Determining stability of proteins from guanidinium chloride transition curves. **The Biochemical journal**, v. 287, p. 481–485, 15 out. 1992.

ASCENZI, P. et al. Steady-state and pre-steady-state kinetics of the trypsin-catalysed hydrolysis of α -CBZ-L-lysine-p-nitrophenyl ester. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 658, n. 1, p. 158–164, 1981.

BABA, T. et al. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 20, p. 11920–7, 15 jul. 1989.

BALESTRIERI, C. et al. Second-Derivative Spectroscopy of Proteins A Method for the Quantitative Determination of Aromatic Amino Acids in Proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 90, p. 433–440, 1978.

BANUMATHI, E. et al. High-yielding enzymatic method for isolation and culture of microvascular endothelial cells from bovine retinal blood vessels. **Microvascular research**, v. 77, n. 3, p. 377–81, maio 2009.

BARRETT, D. Zymogen activation as a sensitive enzyme-amplifying assay for a protease with tryptic specificity. **The Biochemical journal**, v. 117, n. 1, p. 57–9, mar. 1970.

BARROS, P. **Estudo da influência da tripsina, alfa-tripsina e paracetamol no desenvolvimento de granulação, em ratos**. Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo: Tese (Doutorado em ciências), 1989.

BEARDSLEE, R. A.; ZAHNLEY, J. C. A Simple Preparation of β -Trypsin Based on a Calorimetric Study of Thermal Stabilities of α and β -Trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 158, p. 806–811, 1973.

BECKTEL, W. J.; SCHELLMAN, J. A. Protein Stability Curves. **Biopolymers**, v. 26, p. 1859–77, 1987.

BEN KHALED, H. et al. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 123–133, mar. 2011.

REFERENCIAS

- BIER, M.; NORD, F. F. On the mechanism of enzyme acition. XLVI. The effect of certain ions on crystalline trypsin and reinvestigation of its isoelectric point. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 33, p. 320–332, 1951.
- BITTAR, E. R. et al. Characterization of beta-trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, n. 12, p. 1621–1627, 2003.
- BODE, W.; FEHLHAMMER, H.; HUBER, R. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1-8 Å resolution. I. Data collection, application of patterson search techniques and preliminary structural interpretation. **Journal of molecular biology**, v. 106, n. 2, p. 325–35, 15 set. 1976.
- BODE, W.; SCHAWAGER, P. The single calcium-binding site of crystallin bovin beta-trypsin. **FEBS Letters**, v. 56, n. 1, p. 139–143, 1975.
- BODE, W.; SCHWAGER, P.; HUBER, R. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 118, n. 1, p. 99–112, 5 jan. 1978.
- BROCKWELL, D. J.; SMITH, D. A; RADFORD, S. E. Protein folding mechanisms: new methods and emerging ideas. **Current opinion in structural biology**, v. 10, n. 1, p. 16–25, fev. 2000.
- CHIANCONE, E. et al. Dynamic and structural properties of the calcium binding site of bovine serine proteases and their zymogens. A multinuclear nuclear magnetic resonance and stopped-flow study. **Journal of molecular biology**, v. 185, n. 1, p. 201–7, 5 set. 1985.
- COHEN, D. S.; PIELAK, G. J. Stability of yeast iso- 1-ferricytochrome c as a function of pH and temperature. **Protein Science**, v. 3, n. 8, p. 1253–1260, 1994.
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10363–70, 29 out. 1991.
- DAVIE, E. W.; NEURATH, H. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 212, p. 515–29, 1955.
- DILL, K. A. et al. The Protein Folding Problem. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular**, v. 37, p. 289–316, 2008.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271–278, 1961.

REFERENCIAS

- EYL, A.; INAGAMI, T. Modification of carboxyl groups in the active site of trypsin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 38, n. 1, p. 149–155, 1970.
- FIGUEROLA, A. M. J. Los enzimas proteolíticos en el tratamiento de las infecciones del aparato respiratorio. **Medicina Clínica**, v. 28, n. 1/2, p. 106–109, 1957.
- FOUCAULT, G. et al. Comparative study of some conformational properties of α , β and Ψ bovine trypsins. **Biochimie**, v. 56, n. 2, p. 1343–1350, 1974.
- FOUCAULT, G.; SEYDOUX, F.; YON, J. Comparative Kinetic Properties of α , β and Ψ Forms of Trypsin. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 295–302, 1974.
- GORINI, L. Calcium role in trypsin-serum albumin system. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 7, p. 318–334, 1951.
- HAYNIE, D. T. Gibbs free energy-applications. In: **Biological Thermodynamics**. Cambridge ed. New York: [s.n.]. p. 119–78.
- HILSER, V. J. Modeling the native state ensemble in protein structure, stability and folding. In: MURPHY, K. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. Totowa, N J: Human press, 2001. p. 93–116.
- INNERFIELD, I.; ANGRIST, A.; SCHEARZ, A. Parenteral administration of trypsin clinical effect in 538 patients. **The journal of the American Medical Association**, v. 152, n. 7, p. 597–605, 1953.
- JAKUBOWSKI, H. **Protein Structure**. Disponível em: <<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/olhydrophobp rot.html>>. Acesso em: 20 ago. 2013.
- JOHNSON, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 35, n. 3, p. 307–312, 15 maio 1999.
- JOHNSON, W. C. J. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 17, p. 175–166, 1988.
- KEIL, B. Trypsin. In: BOYER, P. D. (Ed.). **The enzymes**. 3. ed. New York e London: Academic Press, 1971. p. 257.
- KLEIN, G. et al. Efficacy and tolerance of an oral enzyme combination in painful osteoarthritis of the hip. A double-blind, randomised study comparing oral enzymes with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 24, n. 1, p. 25–30, 2006.
- KUMAR, A.; VENKATESU, P. Overview of the stability of α -Chymotrypsin in different solvent media. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 4283–4307, 2012.

REFERENCIAS

- LAZDUNSKI, M.; DELAAGE, M. On the reactivity of ionisable functions of bovine and porcine trypsinogens. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 105, p. 541–561, 1965.
- LEBERMAN, R. The Hofmeister series and ionic strength. **FEBS Letters**, v. 284, n. 2, p. 293–294, 24 jun. 1991.
- LESK, A. M. Evolution in selected proteins families. In: **Introduction to Protein Architecture**. Oxford Uni ed. Oxford: [s.n.]. p. 204–16.
- LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal of molecular biology**, v. 258, n. 3, p. 501–37, 10 maio 1996.
- LIGHT, A.; HIGAKI, J. N. Detection of intermediate species in the refolding of bovine trypsinogen. **Biochemistry**, v. 26, n. 17, p. 5556–5564, 1987.
- MACH, H. et al. Examination of phenylalanine microenvironments in proteins by second-derivative absorption spectroscopy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 287, n. 1, p. 33–40, 1991.
- MANHART, N. et al. Administration of proteolytic enzymes bromelain and trypsin diminish the number of CD4+ cells and the interferon- gamma response in Peyer's patches and spleen in endotoxemic balb/c mice. **Cellular Immunology**, v. 215, n. 2, p. 113–119, fev. 2002.
- MAROUX, S.; ROVERY, M.; DESNUELLE, P. Hydrolysis by bovine trypsin of some aromatic bonds in high molecular weight peptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 122, p. 147–150, 1966.
- MAROUX, S.; ROVERY, M.; DESNUELLE, P. An autolyzed and still active form of bovine trypsin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 140, p. 377–380, 1967.
- MARTIN, H. Proteolytic enzymes in podiatry. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 50, p. 207–208, 1960.
- MARTINS, N. F. **Purificação, caracterização e determinação da estabilidade termodinâmica de tripsinogênio e formas ativas de tripsina**. Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Minas Gerais: Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia), 1998.
- MARTINS, N. F. et al. The denaturation of alpha, beta and psi bovine trypsin at pH 3.0: evidence of intermediates. **Protein and peptide letters**, v. 10, n. 1, p. 73–81, fev. 2003.
- MARTINS, N. F.; SANTORO, M. M. Partially folded intermediates during trypsinogen denaturation. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 6, p. 673–82, jun. 1999.

REFERENCIAS

- MCDONALD, M. R.; KUNITZ, M. The effect of calcium and other ions on the autocatalytic formation of trypsin from trypsinogen. **The journal of general physiology**, v. 25, n. 53-73, 1941.
- MERGNY, J.; LACROIX, L. Analysis of Thermal Melting Curves. **Oligonucleotides**, v. 13, p. 515–537, 2003.
- MIKES, O. et al. Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 24, n. 3, p. 346–352, 1966.
- NASSER BRUMANO, M. Thermodynamics of Unfolding of β -Trypsin at pH 2.8. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, n. 1, p. 57–62, 1 out. 2000.
- NORD, F. F.; BIER, M. On the Mechanism of Enzyme Action. LV. A study of the interaction between calcium and trypsin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 12, p. 56–66, 1953.
- OUTZEN, H. et al. Temperature and pH sensitivity of trypsins from Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 115, n. 1, p. 33–45, set. 1996.
- PACE, N. C.; SHIRLEY, B. A.; THOMSON, J. A. Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein Structure**. Oxford Uni ed. New York: [s.n.]. p. 311–29.
- PADRÓS, E. et al. The state of tyrosine and phenylalanine residues in proteins analyzed by fourth-derivative spectrophotometry. **European Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 1, p. 117–122, 1982.
- PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.
- PEREIRA, G.; PADOVAN, G. Associação enzimático - analgésica em odontologia. **Hospital**, v. 73, n. 2, p. 655–661, 1968.
- PERKINS, S. J.; WUTHRICH, K. Conformation transition from trypsinogen to trypsin, ^1H nuclear magnetic resonance at 360MHz and ring current calculation. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, n. 1, p. 43–64, 1980.
- PERNOD, J.; ARCHAME, M. D. Action sur bronchorrhée de 1 association enzymes proteolytique du pancreas et tetracyclina. **Thérapie**, v. 20, p. 721–729, 1965.
- PRIVALOV, P. L. Stability of Proteins Small Globular Proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 33, p. 167–241, 1979.
- PRIVALOV, P. L. Thermodynamic problems of protein structure. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 18, p. 47–69, jan. 1989.

REFERENCIAS

RAGONE, R. et al. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy. **Biochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1871–1875, 1984.

ROBINSON, N. C.; NEURATH, H.; WALSHY, K. A. Relation of the α -amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation. **Biochemistry**, v. 12, n. 3, p. 420–426, 1973.

SANTOS, A. M. C. et al. Improved Purification Process of β - and α -Trypsin Isoforms by Ion-Exchange Chromatography. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 711–721, 2008a.

SANTOS, A. M. C. et al. Physical-chemical characterization and stability study of alpha-trypsin at pH 3.0 by differential scanning calorimetry. **International journal of biological macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 278–84, 1 abr. 2008b.

SANTOS, A. M. C. **Purificação e caracterização bioquímica do tripsinogênio, alfa e psi tripsina bovina e análise termodinâmica em meio ácido por calorimetria diferencial de varredura**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 2009.

SCHROEDER, D. D.; SHAW, E. Chromatography of trypsin and its derivatives. Characterization of a new active form of bovine trypsin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 11, p. 2943–2949, 1968.

SCHUCHERT-SHI, A.; HAUSER, P. C. Peptic and tryptic digestion of peptides and proteins monitored by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Analytical biochemistry**, v. 387, n. 2, p. 202–7, 15 abr. 2009.

SHAHIDI, F.; KAMIL, Y. V. A. J. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 435–464, 2001.

SHERRY, S.; FLETCHER, A. P. Proteolytic enzymes: A therapeutic evaluation. **Clinical Pharmacology e Therapeutics**, v. 1, n. 2, p. 202–226, 1960.

SMITH, R. L.; SHAW, E. Pseudotrypsin. A modified bovine trypsin produced by limited autodigestion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 17, p. 4704–4712, 1969.

SOLEIMANI, M.; NADRI, S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. **Nature Protocols**, v. 4, p. 102–106, 2009.

SPOLAR, R. S.; RECORD, M. T. Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 777–84, 11 fev. 1994.

STOYTICHEVA, M. et al. High sensitive trypsin activity evaluation applying a nanostructured QCM-sensor. **Biosensors & bioelectronics**, v. 41, p. 862–6, 15 mar. 2013.

REFERENCIAS

TAMURA, A.; PRIVALOV, P. L. The entropy cost of protein association. **Journal of molecular biology**, v. 273, n. 5, p. 1048–60, 14 nov. 1997.

TEIXEIRA, A. E. **Purificação e caracterização de uma nova forma ativa de tripsina**. Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Minas Gerais: Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia), 1977.

TISHCHENKO, V. M.; GORODKOV, B. G. Calorimetric study of heat denaturation of beta-trypsin. **Biofizika**, v. 24, n. 2, p. 334–335, 1979.

UGOLINI, O. O uso das enzimas proteolíticas nas broncopneumopatias. **Revista Paulista de Medicina**, v. 62, n. 2, p. 102–108, 1963.

VELLARD, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 444–450, ago. 2003.

VIANA, P. A et al. Spectroscopic and thermodynamic properties of *Debaryomyces hansenii* UFV-1 alpha-galactosidases. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 3, p. 298–303, 1 abr. 2010.

WALSH, K. A.; NEURATH, H. Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 52, p. 884–889, 1964.

WHITAKER, J. R.; BENDER, M. L. Kinetics of Papain-Catalyzed Hydrolysis of Alpha-N-Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester and Alpha-N-Benzoyl-L-Argininamide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 1956, p. 2728–37, 20 jun. 1965.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic acids research**, v. 32, p. 668–673, 1 jul. 2004.

YANG, M. et al. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 91, n. 1, p. 354–61, out. 2009.