

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA

PAMELA ZANON

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E FARMACOLÓGICA DE
UM NOVO INIBIDOR DE PROTEINASES DO TIPO BOWMAN-BIRK ISOLADO
DE *CANAVALIA ENSIFORMIS***

Porto Alegre
2019

PAMELA ZANON

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E FARMACOLÓGICA DE
UM NOVO INIBIDOR DE PROTEINASES DO TIPO BOWMAN-BIRK ISOLADO
DE *CANAVALIA ENSIFORMIS***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do título de
Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Markus Berger.

Porto Alegre
2019

PAMELA ZANON

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E FARMACOLÓGICA DE
UM NOVO INIBIDOR DE PROTEINASES DO TIPO BOWMAN-BIRK ISOLADO
DE *CANAVALIA ENSIFORMIS***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do título de
Farmacêutico.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Markus Berger.
HCPA - Centro de Pesquisa Experimental,
Laboratório de Bioquímica Farmacológica.

Examinador: Prof. Dr. Eduardo Luis Konrath.
UFRGS - Faculdade de Farmácia, Departamento
de Produção de Matéria Prima.

Examinador: Prof. Dr. Walter Orlando Beys da
Silva.
UFRGS - Faculdade de Farmácia, Departamento
de Produção de Matéria Prima.

Porto Alegre, ____ de ____ de ____.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Markus Berger do laboratório de bioquímica farmacológica do CPE-HCPA, não só pela constante orientação para a construção e finalização do meu trabalho de conclusão de curso, mas também, pela confiança em me encarregar do desenvolvimento de um trabalho complexo e completo, por me tornar um profissional confiante e responsável, através dos anos de conhecimento e dedicação a minha formação como pesquisadora e principalmente, por ser um grande amigo.

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que contribuíram na realização deste trabalho como a professora Renata Cristina de Sousa Ramos que é coordenadora do Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde – ITT Nutrifer da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), por fornecer as sementes de *Canavalia ensiformis* para a realização deste trabalho, aos professores Lucélia Santi e Walter Orlando Beys da Silva pela realização do sequenciamento do inibidor e a professora Paula Barros Terraciano por fornecer o espaço no laboratório de embriologia e diferenciação celular no CPE-HCPA, necessário para realização dos experimentos *in vitro* com VSMC.

RESUMO

Na visão clássica do sistema renina-angiotensina (RAS), a angiotensina II (Ang II) é gerada pela ação da enzima conversora de angiotensina (ACE). Evidências recentes vêm sugerindo que possam existir vias alternativas de geração de Ang II no ambiente intracelular em determinadas condições patológicas. Nesses casos a principal enzima conversora de Ang II é a quimase. Em condições de hiperglicemia, produtos avançados de glicação podem ativar quimase, desviando toda a rota de geração de Ang II, causando hipertrofia e aumento de proliferação em células musculares lisas de vasos (VSMCs). Neste trabalho descrevemos a caracterização estrutural e farmacológica de uma nova molécula capaz de bloquear a quimase e uma série de eventos mediados por Ang II *in vitro* e *in vivo*. A molécula capaz de inibir quimase foi isolada das sementes de *Canavalia ensiformis*, após precipitação com sulfato de amônio e métodos de cromatografia de troca aniônica e afinidade em coluna de tripsina-sepharose. A estrutura do peptídeo isolado foi caracterizada por espectrometria de massas e métodos de modelagem molecular. O processo de inibição foi caracterizado com substrato sintético cromogênico para quimase e tripsina. As alterações vasculares foram estudadas *in vivo* em modelo de permeabilidade vascular em ratos e *in vitro* em cultura de células da musculatura lisa de aorta (linhagem A7r5-VSMCs). A nova molécula (denominada CETI) possui massa molecular de 8.173 daltons, é um trímero em solução aquosa, a estrutura é rica em cisteínas, resistente às variações de temperatura e pH e apresenta duas alças inibitórias, uma capaz de inibir tripsina (IC₅₀ 21,68 nM) e outra capaz bloquear quimase (IC₅₀ 13,80 nM). É um inibidor competitivo de quimase e não-competitivo de tripsina. CETI bloqueia a geração de Ang II mediada por quimase humana e a atividade tipo-quimase de mastócitos isolados do peritônio de ratos. Também reduz a permeabilidade vascular induzida por um degranulador de mastócitos (composto 48/80) *in vivo*. VSMCs cultivadas em meio hiperglicêmico (glicose 25 mM) apresentam um aumento na geração intracelular de Ang II que é reduzida após o tratamento prévio com CETI. O inibidor também atenua uma série de eventos mediados por Ang II em VSMCs, tais como migração, proliferação e geração de espécies reativas de oxigênio. Neste trabalho descrevemos a caracterização inédita de uma molécula capaz de bloquear uma via não-clássica do RAS, tendo, possivelmente aplicação terapêutica promissora em desordens vasculares.

Palavras-chave: Inibidor, quimase, tripsina, aneurisma de aorta, angiotensina, Bowman-Birk, mastócitos.

ABSTRACT

In the classical view of the renin-angiotensin system (RAS), angiotensin II (Ang II) is generated by the action of angiotensin converting enzyme (ACE). Recent evidence suggests that there are alternatives for the generation of Ang II in the intracellular environment under pathological conditions. In such cases, the major Ang II converting enzyme is a chymase. Under conditions of hyperglycemia, advanced glycation products can activate chymase, disable the entire ang II generation pathway, cause hypertrophy, and increase vessel smooth muscle cell proliferation (VSMCs). In this work, we described the structural and pharmacological characterization of a novel molecule able to blocking chymase and a series of Ang II-mediated events *in vitro* and *in vivo*. A molecule able of inhibiting chymase and trypsin was isolated from *Canavalia ensiformes* seeds after ammonium sulfate precipitation, anion exchange chromatography and affinity chromatography in trypsin-sepharose column. The isolated peptide structure was characterized by mass spectrometry and molecular modeling methods. The inhibition process was characterized with chromogenic synthetic substrates for chymase and trypsin. Vascular changes were also studied *in vivo* by rat vascular permeability model and *in vitro* with the aortic smooth muscle cells in culture (A7r5-VSMCs). The new molecule (named as CETI) has a molecular mass of 8,173 Daltons, is a trimer in solution, its structure is rich in cysteines, resistant to temperature and pH variations and has two inhibitory loops, one being able to inhibit trypsin (IC₅₀ 21.68 nM), and another able to block chymase (IC₅₀ 13.80 nM). It is a competitive chymase inhibitor and noncompetitive inhibitor of trypsin. CETI blocks human chymase mediated-Ang II generation and chymase-like activity of mast cells isolated from rat peritoneum. It also reduces vascular permeability induced by a mast cell degranulator (compound 48/80) *in vivo*. VSMCs cultured in hyperglycemic medium (25 mM glucose) show an increase in intracellular Ang II generation which is attenuated after prior treatment with CETI. The inhibitor also attenuates a number of Ang II-mediated events in VSMCs, such as migration, proliferation, and generation of reactive oxygen species. In this work, we describe for the first the characterization of a molecule able to block a non-classical RAS pathway, possibly having promising therapeutic application in vascular disorders.

Keywords: Inhibitor, chymase, trypsin, aortic aneurysm, angiotensin, Bowman-Birk, mast cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão clássica do sistema renina-angiotensina e calicreína-cininas.....	12
Figura 2. Vias alternativas de geração de Ang II em células de musculature lisa vascular e cardiomiócitos em condições de hiperglicemia.....	13
Figura 3. Visão atualizada do Sistema renina-angiotensina.....	15
Figura 4. Múltiplas funções da quimase.....	16
Figura 5. Estrutura tridimensional de um IBB.....	17
Figura 6. Aspectos morfológicos da <i>C. ensiformis</i> e suas sementes.....	17
Figura 7. Isolamento do CETI (<i>Canavalia ensiformis trypsin inhibitor</i>) por romatografia de afinidade em tripsina-sepharose.....	28
Figura 8. Análise das frações da tripsina-sepharose por eletroforese e espectrometria de massas.....	29
Figura 9. Caracterização estrutural do inibidor de <i>C. ensiformis</i>	31
Figura 10. Estabilidade estrutural.....	31
Figura 11. Capacidade inibitória do CETI sobre diferentes serino-proteínases.....	32
Figura 12. CETI inibe tripsina de maneira dose-dependente.....	33
Figura 13. Modelo cinético de inibição de tripsina.....	34
Figura 14. CETI inibe quimase de maneira dose-dependente.....	35
Figura 15. Modelo cinético de inibição de quimase.....	36
Figura 16. CETI inibe a geração de angiotensina II por quimase humana.....	37
Figura 17. CETI inibe quimase secretada por mastócitos isolados do peritônio de ratos e reduz a permeabilidade vascular <i>in vivo</i>	38
Figura 18. O meio hiperglicêmico induz a atividade de quimase em células de aorta e aumenta a geração de Ang II.....	39
Figura 19. O CETI reduz a atividade da quimase e a geração de Ang II intracelular em VSMCs cultivadas em meio hiperglicêmico.....	40

Figura 20. CETI reduz a proliferação celular em meio hiperglicêmico, mas não é tóxico para células vasculares de aorta.....	41
Figura 21. O meio hiperglicêmico induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o CETI reduz esse efeito em células vasculares.....	42
Figura 22. CETI reduz a migração de células vasculares induzida em meio hiperglicêmico.....	42
Figura 23. Representação esquemática e principais resultados obtidos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE/ECA	Enzima conversora de angiotensina
AGE's	Produtos avançados de glicação
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT1R	Receptor de angiotensina tipo 1
CETI	(<i>Canavalia ensiformis trypsin inhibitor</i>)
CONCEA	Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
ERK 1/2	Quinase regulada por sinal extracelular
IBB	Inibidores tipo Bowman-Birk
ITT-Nutrifor	Instituto Tecnológico em Alimentos para Saúde
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MMPs	pro-Metaloproteinases de matriz
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
Nox	NADPH oxidase
RAS	Sistema renina-angiotensina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
UEA/HCPA	Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
VSMCs	Células musculares lisas de vasos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

Juntamente com a noradrenalina, vasopressina e endotelina, a angiotensina II (Ang II) é um dos mais potentes hormônios pressóricos sistêmicos produzidos no organismo. A Ang II é um peptídeo de 8 aminoácidos (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) gerado no plasma por proteólise limitada através da ação da renina e da enzima conversora de angiotensina (ECA). Na visão mais clássica do sistema renina-angiotensina, a renina atua diretamente sobre o angiotensinogênio liberando angiotensina I (Ang I) e a ECA cliva então a Ang I gerando Ang II (**Fig. 1**) (FERRARIO, 2006; BADER, 2010). A Ang II exerce efeito pressórico principalmente sobre a vasculatura coronariana, renal, cerebral e adrenal (NEHME *et al.*, 2015; NEHME *et al.*, 2019). Em condições fisiológicas normais, o organismo responde a uma redução de pressão arterial, redução de volume circulante ou redução de sódio, através da liberação de renina pelas células mesangiais do aparato justaglomerular dos rins. Uma vez liberada a renina atuará na formação de Ang II que, portanto, exercerá o efeito pressórico por desencadear uma série de eventos, entre eles: *i.* aumentar a liberação de aldosterona, reduzindo a excreção renal de sódio e água; *ii.* aumentar a resistência da arteríola eferente nos rins; *iii.* aumentar a expressão de transportadores de sódio nos túbulos renais, aumentando assim a reabsorção de sódio e *iv.* estimular a liberação de vasopressina pela hipófise e a sensação de sede (EGUCHI *et al.*, 2018; SIEVERS & ECKARDT, 2019).

Em um organismo saudável diferentes eixos contra-regulatórios vasodilatadores (como o sistema das cininas, por exemplo) também atuam concomitantemente garantindo a homeostasia do sistema vascular (**Fig. 1**) (MARCEAU & REGOLI, 2004). No entanto, em determinadas situações patológicas pode ocorrer um aumento na geração de Ang II. De fato, a ideia de que níveis circulantes excessivos de Ang II estão associados às doenças cardiovasculares surgiu no início da década de 70 quando se observou que a infusão de Ang II em coelhos causava infarto agudo e necrose do miocárdio (GAVRAS *et al.*, 1971). A partir de então vários dados epidemiológicos vem apontando para a existência clara de associação entre os níveis circulantes de Ang II e o risco de eventos cardiovasculares, mais especificamente com hipertrofia e remodelamento cardíaco, hipertensão, arritmias cardíacas, disfunção endotelial, remodelamento vascular, aterosclerose, diabetes, trombose, nefropatias e aneurisma (FERRARIO, 2006).

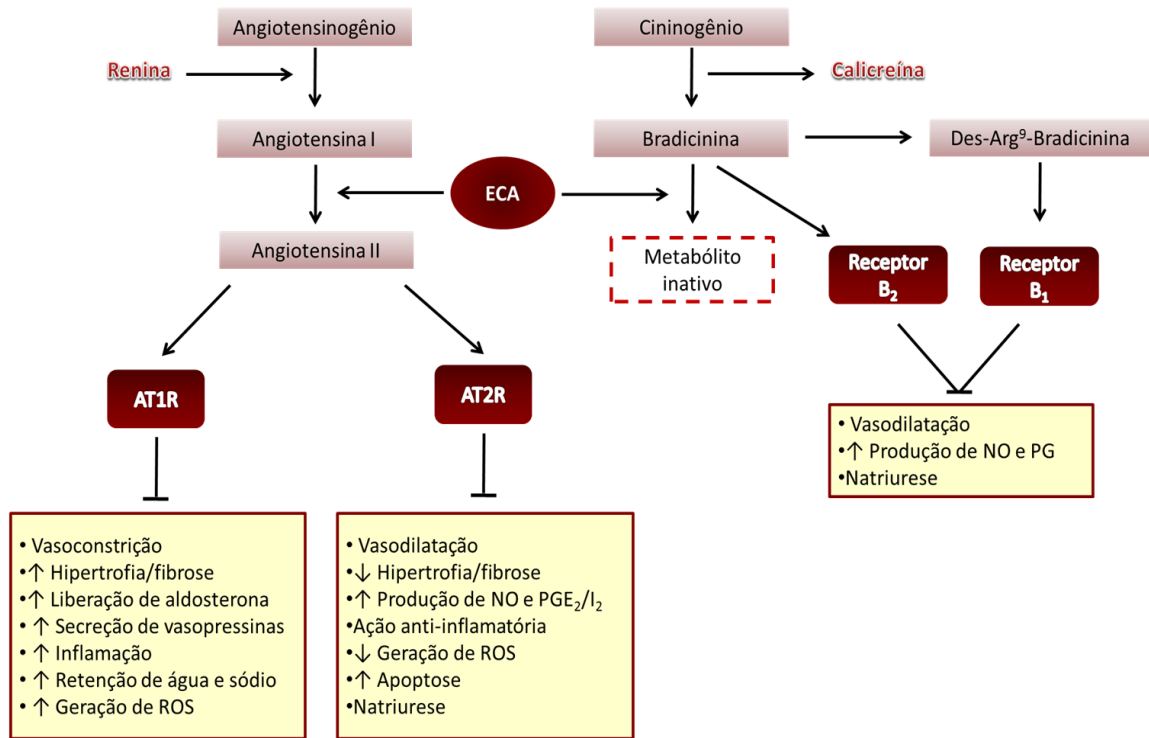


Figura 1. Visão clássica do sistema renina-angiotensina e caliceína-cininas. Representação clássica dos principais zimogênios, enzimas, peptídeos vasoativos e receptores dos sistemas renina-angiotensina e caliceína-cininas. Fonte: Modificado de Nehme *et al.*, 2019.

Muito além da função hormonal sistêmica de controle do volume do fluido extracelular e pressão, a Ang II atua diretamente nas células endoteliais e musculares lisas de vasos através da ação principal sobre o receptor AT1 (**Fig. 1**). Talvez seja exatamente essa ativação via AT1R que torne mais clara a participação da Ang II na fisiopatologia das doenças vasculares (SANTOS *et al.*, 2000). A ativação do AT1R pela Ang II em células vasculares leva ao aumento de proliferação, hipertrofia e hiperplasia, aumenta a capacidade migratória das células, ativa a NADPH oxidase e aumenta a produção de superóxido, estimula a translocação de NF-κB ao núcleo e o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e também leva ao aumento na expressão de moléculas de adesão celular e fibrose, como TGF-β (EGUCHI *et al.*, 2018).

Uma série de evidências experimentais recentes vêm demonstrando que elementos do sistema renina-angiotensina estão ativos não somente no plasma ou no interstício, mas também no ambiente intracelular onde participam efetivamente na geração de segundos mensageiros, ativação de receptores e sinalização celular (LAVRENTYEV *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2008; FROOGH *et al.*, 2016). Vias alternativas de ativação do sistema renina-angiotensina e de geração de Ang II, por exemplo, são diferencialmente reguladas em diferentes tipos de células e em determinadas condições patológicas específicas. Células da musculatura

lisa vascular e cardiomiócitos em ambientes hiperglicêmicos acabam ativando vias alternativas do sistema renina-angiotensina onde a principal enzima responsável pela liberação de Ang II é a quimase e não a ECA (**Fig. 2**) (LAVRENTYEV *et al.*, 2007). A quimase é uma serino-proteinase do tipo-quimotripsina que é expressa principalmente em células do sistema cardiovascular (cardiomiócitos e células da musculatura lisa vascular), renal (células mesangiais) e em células inflamatórias como neutrófilos e mastócitos (DELL'ITALIA *et al.*, 2018). Em condições de hiperglicemia, produtos avançados de glicação (AGE's) comumente gerados no processo acabam ativando a produção de espécies reativas de oxigênio e vias de sinalização como a ERK 1/2 que aumentam a expressão de quimase, tornando essa enzima a principal fonte de geração de Ang II (LAVRENTYEV *et al.*, 2007). Já em condições normoglicêmicas a expressão de quimase não é induzida e a ECA passa a ser a principal enzima liberadora de Ang II (**Fig. 2**) (LAVRENTYEV *et al.*, 2007; FROOGH *et al.*, 2017). Além da quimase uma série de outras enzimas parecem participar do metabolismo das angiotensinas no ambiente intracelular, como a catepsina D que cliva o angiotensinogênio gerando Ang I e também as aminopeptidases ácida, básica e neutra que participam das vias de degradação de Ang II e regulam a meia-vida desses peptídeos (**Fig. 3**) (NEHME *et al.*, 2019).

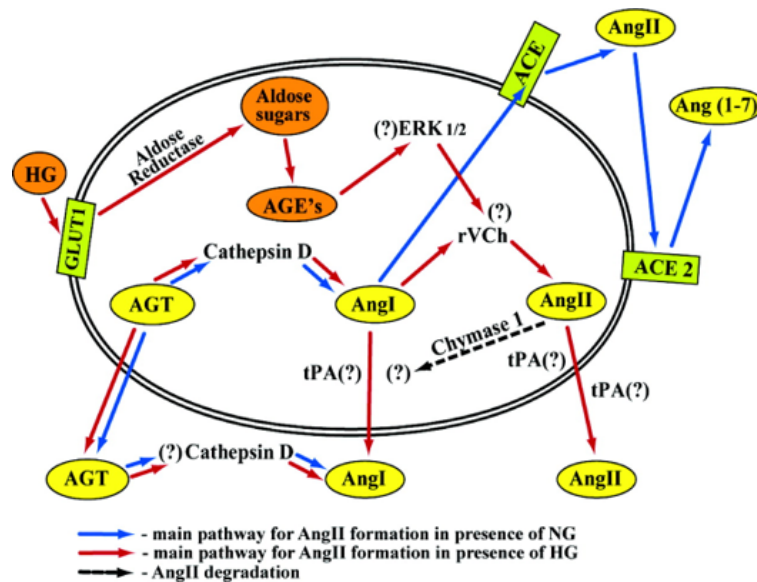


Figura 2. Vias alternativas de geração de Ang II em células da musculatura lisa vascular e cardiomiócitos em condições de hiperglicemia. Em meio hiperglicêmico (HG) a quimase (rVCh) passa a ser a principal via de geração intracelular de Ang II e não a enzima conversora de angiotensina (ECA ou ACE), que atua na formação de Ang II principalmente no ambiente extracelular e em condições normoglicêmicas. Fonte: LAVRENTYEV *et al.*, 2007.

A Ang II intracelular gerada via quimase participa principalmente na regulação positiva de eventos de proliferação e migração celular e aumento na produção de espécies reativas de

oxigênio. No diabetes a Ang II intracelular estimula a proliferação e migração das células da musculatura lisa vascular aumentando o espessamento da parede do vaso e favorecendo a deposição e acúmulo de células inflamatórias, adesão plaquetária e formação de trombos (DELL'ITALIA *et al.*, 2018). No aneurisma de aorta a Ang II gerada via quimase também participa de mecanismo semelhante estimulando proliferação e migração de células vasculares, mas, nesse caso específico, a própria quimase ainda pode contribuir para o quadro patológico, uma vez que é uma das enzimas ativadoras do pró-TGF- β e também da pro-metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) (NOSOUDI *et al.*, 2015) (**Fig. 4**). Nesses casos, a quimase que ativa as MMPs acabam sendo provenientes não só das células vasculares, mas também de mastócitos e neutrófilos que são atraídos para a região de inflamação crônica que se forma em torno do aneurisma. A MMP-9 ativa degrada a matriz extracelular perivascular e, juntamente com o aumento de proliferação das células vasculares e inflamação, contribui sobremaneira para a progressão e rompimento do vaso no caso de um aneurisma (LONGO *et al.*, 2002) (**Fig. 4**). Todos esses eventos fazem da quimase um alvo interessante para o controle alternativo da geração de Ang II. Importante mencionar que alguns estudos já indicam que os inibidores da ECA, classicamente utilizados como forma de tratamento, podem não ser a indicação terapêutica mais acertada, já que a Ang II se forma majoritariamente de forma independente da ECA (INOUE *et al.*, 2009).

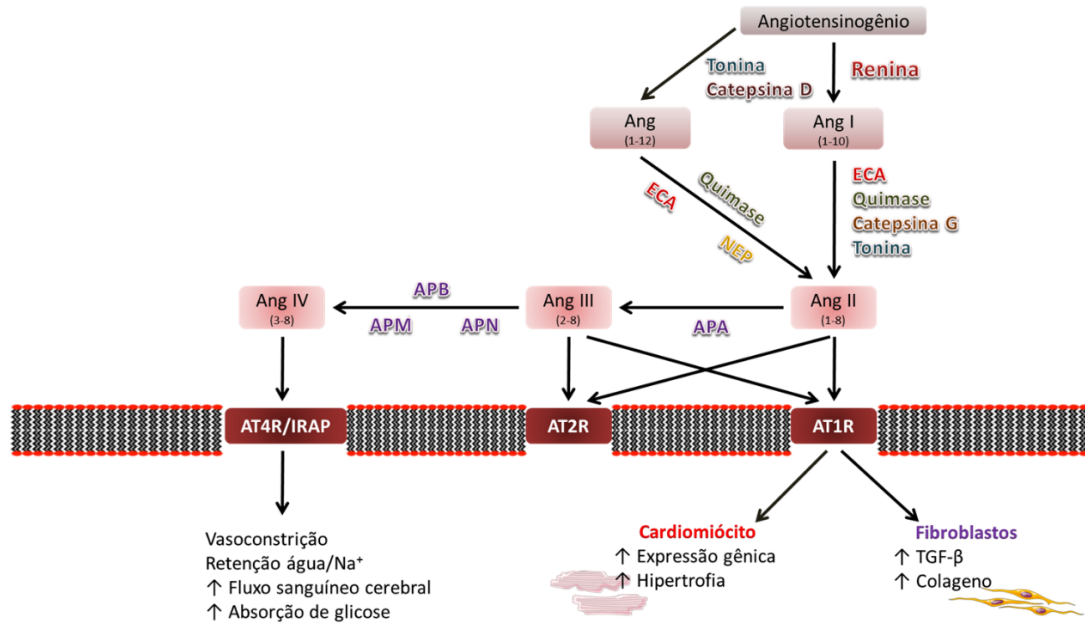


Figura 3. Visão atualizada do sistema renina-angiotensina. Representação esquemática das principais enzimas e vias de metabolização e geração das angiotensinas. ECA, enzima conversora de angiotensina; NEP, endopeptidase neutra; APA, aminopeptidase A; APB, aminopeptidase B; APM, aminopeptidase M; APN, aminopeptidase N. Fonte: Modificado de NEHME *et al.*, 2019.

Uma revisão recente apontou a existência de cerca de 7 patentes da indústria farmacêutica para novas moléculas inibidoras de quimase (AHMAD & FERRARIO, 2018). A maioria delas são derivados de quinazolinédionas ou benzimidazolonas e até o momento apenas uma molécula sintetizada pela Bayer Pharma (*Fulacimstat* - BAY1142524) evoluiu para estudos clínicos de fase I e II para tratamento de infarto agudo do miocárdio com disfunção ventricular esquerda (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT02976467) e doença renal do diabetes (*ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT03412006) (DÜNGEN *et al.*, 2019; KANEFENDT *et al.*, 2019).

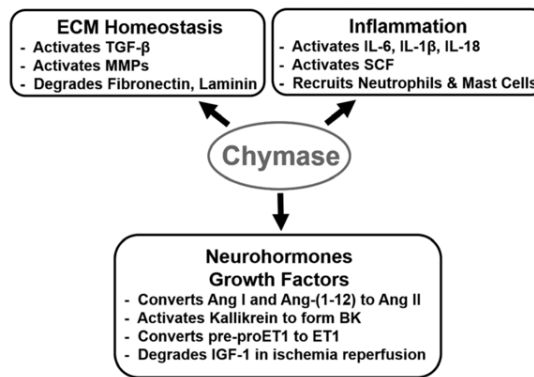


Figura 4. Múltiplas funções da quimase. Além ser uma via alternativa de geração de Ang II, a quimase ainda cliva uma série de zimogênios gerando as formas ativas de metaloproteinases de matriz (MMPs), interleucinas, fatores de crescimento e também participa na degradação de diferentes proteínas de matriz extracelular. Fonte: DELL'ITALIA *et al.*, 2018.

Com relação à produtos de origem natural, inibidores de serino-proteinases encontrados em sementes de leguminosas são também alternativas interessantes. Particularmente aqueles da classe dos inibidores do tipo Bowman-Birk (IBB) (**Fig. 5A**) podem ser promissores, já que possuem baixa massa molecular (variando de 8 à 12 kDa), estabilidade frente a amplas variações de pH e temperatura, resistência à degradação enzimática, alta especificidade, solubilidade em água e biodisponibilidade oral (MCBRIDE *et al.*, 2002; QU *et al.*, 2003). Outra característica da classe dos IBB é a presença de mais de um domínio inibitório na estrutura, que permite a inibição de duas serino-proteinases iguais ou diferentes de forma independente (GROSSE-HOLZ & VAN DER HOORN, 2016) (**Fig. 5B**). De uma maneira geral, a estrutura dos inibidores da classe é conservada podendo ocorrer arranjos na forma de dímeros ou trímeros em solução e apresentando em cada domínio inibitório uma alça reativa, unida por uma ponte de dissulfeto entre cisteínas opostas. Essas regiões inibitórias são semelhantes ao sítio alvo das proteases no substrato natural e ficam expostas na molécula permitindo uma fácil interação entre o inibidor e enzima, formando um complexo não-covalente que torna a enzima inativa (LASKOWSKI & KATO, 1980). Os inibidores normalmente apresentam na posição P1 da primeira alça reativa resíduos de lisina ou arginina que conferem maior afinidade de ligação a enzimas tipo-tripsina, enquanto a segunda alça pode apresentar na posição P1 resíduos de aminoácidos que conferem ligação a outros tipos de serino-proteases (MCBRIDE *et al.*, 2002) (**Fig. 5B**). Os IBB possuem amplo potencial de aplicação terapêutica principalmente em condições inflamatórias, pró-trombóticas, em infecções fúngicas e como anti-tumorais (SAMPAIO *et al.*, 1996; PAIVA *et al.*, 2006; OLIVA & SAMPAIO, 2009; SATO *et al.*, 2012; SRIKANTH & CHEN, 2016; MEHDAD *et al.*, 2016).

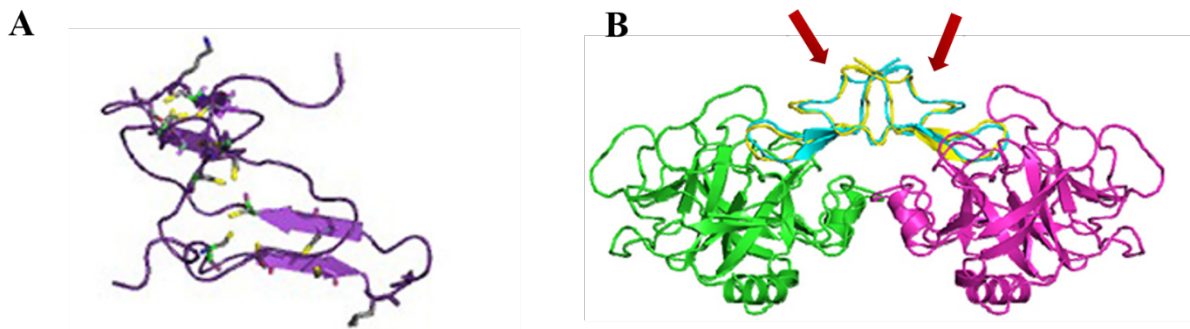


Figura 5. Estrutura tridimensional de um IBB. A. Estrutura cristalográfica do monômero de um IBB isolado de sementes de soja (sp|P01055|IBB1_SOYBN). B. Configuração de um IBB complexado a duas diferentes serino-proteinases (em verde tripsina; em rosa quimotripsina) através das alças reativas (setas vermelhas). Fonte: SRIKANTH & CHEN, 2016.

Neste trabalho, descrevemos pela primeira vez um IBB com estrutura inédita capaz de inibir tripsina em uma das alças reativas e quimase na outra. Esse inibidor foi obtido das sementes de *Canavalia ensiformis*, que é uma leguminosa popularmente conhecida como feijão-de-porco (**Fig. 6**). A espécie ocorre por extensas áreas desde a América Central até a América do Sul, onde por vezes é utilizada como cultura de rotatividade, não só por crescer em terrenos com baixa produtividade, mas por atuar como fitorremediadora, recuperando áreas contaminadas por cobre e alumínio pela capacidade de adsorver em suas raízes metais pesados (YANG *et al.*, 2016; SANTANA *et al.*, 2019). Apesar da alta capacidade produtiva da *C. ensiformis*, suas folhas e frutos não são indicados para consumo *in natura* por apresentar toxicidade comprovada em animais (CARLINI & GUIMARÃES, 1981; UDEDIBIE & CARLINI, 1998). Estudos fitoquímicos mostraram que a semente de feijão de porco contém saponinas cianogênicas, glicosídeos, terpenóides, alcalóides e ácido tânico, além de proteínas e peptídeos tóxicos como a canotoxina, associada a alterações no sistema nervoso central de animais (CARLINI *et al.*, 1984).



Figura 6. Aspectos morfológicos da *C. ensiformis* e suas sementes. Fonte: HEUZÉ & TRAN, 2015.

Tendo como base a experiência prévia do nosso grupo de pesquisas com a identificação e caracterização bioquímica e farmacológica de moléculas proteicas e peptídeos bioativos obtidos de fontes naturais (BERGER *et al.*, 2008; DAHMER *et al.*, 2012; DE PAULA *et al.*, 2013; BEYS-DA-SILVA *et al.*, 2014; BERGER *et al.*, 2015; TIRLONI *et al.*, 2019), neste trabalho propomos avançar nas pesquisas sobre o IBB de *C. ensiformis* caracterizando a sua estrutura, o mecanismo cinético de inibição de quimase e o seu mecanismo de ação *in vitro* em célula muscular lisa de aorta e *in vivo* em modelo de permeabilidade vascular em ratos. Como o controle das vias alternativas de geração de Ang II é tão importante na fisiopatologia de diferentes doenças cardiovasculares, acreditamos que os resultados aqui apresentados nos forneçam subsídios para o avanço no desenvolvimento dessa nova molécula.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar um novo inibidor de quimase do tipo Bowman-Birk obtido de *Canavalia ensiformis* e investigar o seu mecanismo de ação *in vitro* em célula muscular lisa de aorta e *in vivo* em modelo animal de permeabilidade vascular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Purificação, sequenciamento e caracterização estrutural do inibidor de quimase a partir das sementes de *Canavalia ensiformis*;
- ❖ Caracterização cinética, determinação do mecanismo bioquímico de inibição e especificidade;
- ❖ Determinação da estabilidade e dos resíduos de aminoácidos importantes para a atividade biológica;
- ❖ Efeitos do inibidor sobre proteases secretadas por mastócitos;
- ❖ Efeitos anti-inflamatórios do inibidor de quimase em modelo de permeabilidade vascular em ratos;
- ❖ Efeitos do inibidor sobre a proliferação, migração e atividade de quimase intracelular em células de músculo liso de aorta cultivadas em meio hiperglicêmico;
- ❖ Efeitos do inibidor sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células de músculo liso de aorta cultivadas em meio hiperglicêmico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DROGAS E REAGENTES

Tripsina humana, quimase de rato, 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT), DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)), NBT (Nitroblue Tetrazolium), carragenina e os substratos cromogênicos para quimase (Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida) e tripsina (N-Benzoil-DL-Arg-*p*-nitroanilida) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). A sonda CM-H2DCFDA (DCF) e os insumos utilizados em cultura de células: Penicilina/estreptomicina, EDTA, tripsina, soro fetal bovino e os meios de cultura (meio Eagle modificado por Dulbecco - DMEM) enriquecidos com 5 ou 25 mM de glicose foram obtidos da Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). As colunas e/ou resinas cromatográficas utilizadas (Q-sepharose e tripsina-sepharose) foram obtidas da GE Healthcare (Chicago, Illinois, USA). Demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico obtidos de fontes comerciais.

3.2 ISOLAMENTO

As sementes de *Canavalia ensiformis* foram fornecidas pela professora Renata Cristina de Sousa Ramos que é coordenadora do Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde – ITT Nutrifor da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). As sementes foram primeiramente desinfetadas por imersão em hipoclorito de sódio 1% e maceradas em moinho de facas na presença de tampão tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. Foi realizado um primeiro fracionamento por precipitação com sulfato de amônio, seguido de métodos clássicos de purificação por cromatografia líquida em sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). As frações com atividade inibitória sobre tripsina obtidas por cromatografia de troca-aniônica em resina Q-sepharose foram combinadas e filtradas em ultrafiltros com *cutoff* de 30 kDa. Foi realizado uma segunda etapa de purificação com cromatografia de afinidade em coluna tripsina-sepharose, onde o inibidor foi eluído com HCl 100 mM por redução do pH do meio e novamente as frações com atividade inibitória para tripsina foram combinadas e filtradas em ultrafiltro com *cutoff* de 3 KDa. A homogeneidade da preparação foi confirmada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6-20 %) e nativas (Nu-PAGE 6-20 %) na presença e ausênica de β -mercaptoetanol. O inibidor isolado foi denominado

CETI (*Canavalia ensiformis* trypsin inhibitor) e a massa molecular foi determinada por MALDI-TOF/TOF (Bruker, USA) no ITT-Nutrifor, UNISINOS.

3.3 SEQUENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

A sequência de aminoácidos do CETI foi determinada por espectrometria de massas no laboratório do Dr. John Yates III, localizado no The Scripps Research Institute - LaJolla, Califórnia, USA contando também com a colaboração dos Profs. Walter Orlando Beys da Silva e Lucélia Santi da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os peptídeos gerados por digestão triptica foram carregados em um sistema LTQ-XL-Orbitrap (Thermo Fisher, USA), conforme protocolo já descrito na literatura (WASHBURN *et al.*, 2001). Os espectros MS/MS foram analisados, com tolerância de 3 Da, utilizando o pacote de análises IP2 (www.integratedproteomics.com) para a quantificação e identificação da proteína isolada. Como banco de dados para a identificação foram utilizadas as sequências de proteínas depositadas no UniProt (www.uniprot.org) (CARVALHO *et al.*, 2008). A sequência de aminoácidos obtida foi alinhada e comparada com a de outros inibidores da mesma classe isolados de leguminosas e já disponível nos bancos de dados públicos. Um modelo da estrutura tridimensional do inibidor foi construído utilizando como base a estrutura cristalográfica de moléculas homólogas. Os modelos foram obtidos no SWISS-MODEL (*protein structure homology-modelling server*, <https://swissmodel.expasy.org/>) e visualizados no Swiss PDB-Viewer.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE INIBIÇÃO

Tripsina humana ou quimase de rato purificadas foram incubadas com diferentes concentrações do CETI (0 – 250 nM) em 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 e a atividade enzimática residual foi determinada pela adição de 0,2 mM dos substratos cromogênicos sintéticos específicos para quimase (Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida) ou tripsina (N-Benzoil-DL-Arg-*p*-nitroanilida). A cinética de formação de *p*-nitroanilina foi monitorada à 37 °C pelo aumento da absorbância à 405 nm com leituras a cada 14 seg durante 40 min em um leitor de microplacas (SpectraMAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). O tempo de resposta para inibição enzimática foi avaliado adicionando ao substrato uma mistura da enzima+inibidor sem incubação prévia ou através da incubação prévia da enzima+inibidor por 20 min à 37 °C. Os dados de velocidade ou atividade enzimática residual versus concentração de inibidor foram utilizados para os cálculos de IC₅₀ e K_i. O mecanismo de inibição para quimase foi determinado seguindo o método de Lineweaver-Burke e as equações clássicas de Michaelis-

Menten para inibidores competitivos. Para o mecanismo de inibição de tripsina foi utilizada a equação de Morrison para inibidores não-clássicos (CALVO *et al.*, 2011). A especificidade do inibidor (140 nM) foi também determinada pela sua capacidade em bloquear uma série de outras serino-proteinases (40 nM), entre elas, quimotripsina, elastase, trombina, fator Xa, calicreína e plasmina.

3.5 INIBIÇÃO DA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA II POR QUIMASE HUMANA

Quimase humana CMA1 (35 nM) foi incubada à 37 °C na presença ou ausência do CETI (10 – 250 nM) com o substrato natural da enzima, a angiotensina I (MW 1296 Da). Após 30 min alíquotas foram retiradas do meio reacional e a análise dos fragmentos foi imediatamente realizada por espectrometria de massas em um MALDI-TOF mass spectrometer (Shimadzu/Kratos) com capacidade para determinação acurada de peptídeos menores de 3 kDa. A formação de angiotensina II foi monitorada pelo surgimento de um pico com massa correspondente à 1046 Da e redução do pico correspondente à angiotensina I (pico de 1296 Da).

3.6 ESTABILIDADE ESTRUTURAL

A estabilidade do CETI frente a variações de pH, temperatura e presença de agentes redutores. Foi determinada através de ensaio enzimático para tripsina utilizando o substrato cromogênico N-Benzoil-DL-Arg-*p*-nitroanilida seguindo o procedimento descrito acima no item 3.4. O CETI (70 nM) foi incubado em diferentes temperaturas entre 37 e 100° C por 30 min, e a atividade inibitória contra tripsina foi determinada após o resfriamento do inibidor até a temperatura ambiente. Para analisar o efeito do pH, o CETI (70 nM) foi incubado por 30 min a 37 ° C nos seguintes tampões na concentração final de 50 mM: glicina-HCl (pH 2,2), acetato de sódio (pH 4,0), fosfato de sódio (pH 6,0), Tris-HCl (pH 7,5), Tris-HCl (pH 8,0) e glicina-NaOH (pH 10). Após a incubação, a atividade residual da tripsina foi determinada. Para analisar o efeito do agente redutor, o CETI (70 nM) foi incubado com diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT 0,1 a 1,0 mM) previamente à determinação da atividade residual de tripsina.

3.7 ENSAIOS *IN VIVO*

3.7.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com a legislação vigente no Brasil, Lei 11.794/2008, que estabelece os Procedimentos para o Uso

Científico de Animais e com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA (2013). Os modelos experimentais utilizados ainda seguiram as recomendações do Guia de Princípios no Uso de Animais em Toxicologia (International Society of Toxicology, www.toxicology.org). Foram utilizados ratos machos (espécie: *Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar (60 dias, 250-300 g). Os roedores são modelos experimentais bem estabelecidos para os estudos de inflamação e alterações vasculares por ser uma espécie de fácil manejo e permitir a comparação e reprodutibilidade dos resultados (PINTO *et al.*, 1995; KOTSYFAKIS *et al.*, 2006; OLIVA & SAMPAIO, 2009; CHMELAR *et al.*, 2011). Os animais foram obtidos de acordo com os critérios da Unidade de Experimentação Animal do HCPA (UEA/HCPA). Após a obtenção dos animais, os mesmos foram mantidos pelo período mínimo de 15 dias para adaptação no biotério UEA/HCPA, alojados em caixas de polipropileno medindo 41 x 34 x 16 cm (4 animais/caixa), com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura controlada de 20 - 24 °C, umidade relativa do ar de 40-60 % e com água e comida disponíveis *ad libitum*. A manipulação dos animais foi realizada em salas apropriadas para estes fins e exclusivas para pessoal habilitado e treinado. Os resíduos de material biológico e carcaça de animais foram acondicionados em sacos brancos identificados com símbolo de risco biológico, lacrados e armazenados em freezer a -20 °C exclusivo para este fim na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, até o recolhimento semanal pelo setor de coleta especial. Os procedimentos de finalização seguiram as normas indicadas pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Foram utilizadas medidas de antecipação de morte como procedimento de refinamento e proteção/preservação do bem-estar animal, sempre que os animais apresentassem comportamento alterado ou sinais de sofrimento que não pudessem ser controlados com manejo ou analgésicos segundo as principais normativas e recomendações (CONCEA, 2013). Os animais foram avaliados diariamente, caso fosse detectado sofrimento e/ou estresse não responsivos a manejo ou a terapia, os animais eram eutanasiados conforme protocolo já descrito.

As doses administradas do CETI foram determinadas com base na especificidade e potência do inibidor para quimase. Vários dados da mesma classe de inibidores também foram consultados na literatura (SAMPAIO *et al.*, 1996; PAIVA *et al.*, 2006; OLIVA & SAMPAIO, 2009; SATO *et al.*, 2012; MEHDAD *et al.*, 2016; SRIKANTH & CHEN, 2016).

3.7.2 INIBIÇÃO DE QUIMASE DE MASTÓCITOS PERITONEAIS

Um extrato enriquecido em quimase foi obtido de mastócitos peritoneais de ratos. Para tanto, os animais ($n = 5$) foram estimulados pela injeção intraperitoneal de carragenina (0,8 mg) durante 6 h e, após anestesia com isoflurano (5 % para indução e 2 % para manutenção), o peritônio dos ratos foi lavado com 10 mL de ringer-lactato. O lavado de todos os ratos foi recuperado, combinado e os animais foram sacrificados por sobredose anestésica com isoflurano. Os mastócitos presentes no lavado foram parcialmente purificados após centriuação em gradiente de Percoll (70 %) conforme protocolo descrito por Kovarova *et al.*, (2013). Após a separação os mastócitos foram lisados e macerados em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 2 M NaCl. O extrato de mastócitos lisados foi diluído 1:5 no mesmo tampão e incubado na presença ou ausência do CETI (28-140 nM). A atividade residual da quimase de mastócitos foi determinada pela adição do substrato Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (0,2 mM), conforme descrito no item 3.4. Alternativamente, uma mistura do CETI (80 nM) + extrato de mastócitos lisados (10 μ L) foi aplicado em um gel de poliacrilamida (12 %) copolimerizado com caseína 1 %. Nesse caso, após a eletroforese, o SDS foi removido, as proteases foram ativadas pela incubação *overnight* no tampão Triton X-100 1%, Tris-HCl 50mM, CaCl₂ 5mM, ZnCl₂ μ M, pH 7,5 e as bandas de degradação foram visualizadas após adição de coomassie-blue G-250.

3.7.3 MODELO DE PERMEABILIDADE VASCULAR

A permeabilidade vascular foi medida segundo Müller *et al.*, (2009) através da injeção do corante azul de Evans. Para os experimentos de permeabilidade vascular foram utilizados 12 ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300 g (60 dias). Durante todo o experimento os animais foram mantidos sob anestesia geral inalatória com isoflurano vaporizado em oxigênio 100% na dose de 5% para indução e 2% para manutenção (fluxo de 0,5 L/min). O dorso de cada animal foi tricotomizado e cerca de 8 quadrantes iguais foram desenhados no dorso. Em seguida, o corante azul de Evans (50 mg/kg, em volume máximo de 0,3 mL) foi injetado via intravenosa pela veia caudal. Após 5 min, em cada quadrante foi injetado em duplicata por via intradérmica um volume máximo de 100 μ L dos seguintes tratamentos: *Quadrantes 1 e 2*) solução salina estéril (NaCl 0,9 %); *Quadrantes 3 e 4*) Composto 48/80 (agente degranulador de mastócitos) 10 μ g; *Quadrantes 5 e 6*) composto 48/80 (10 μ g) + CETI (3 μ g); *Quadrantes 7 e 8*) CETI (3 μ g). Sessenta minutos após a injeção dos tratamentos os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de isoflurano até a constatação de parada cardiorrespiratória. O tecido subcutâneo do dorso foi cuidadosamente dissecado, os quadrantes foram removidos e incubados em 2,5 mL de formamida 30 % à 55^oC por 24 h para extração do

azul de Evans. Os níveis do corante extraído para a solução de formamida foram medidos por espectrofotometria (600 nm) e a quantidade de azul de Evans extravasada por quadrante foi calculada através de uma curva padrão construída com quantidades conhecidas do corante.

3.8 ENSAIOS *IN VITRO*

3.8.1 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem de células de músculo liso vascular (VSMC, A7r5) obtida da aorta torácica de ratos foi adquirida comercialmente da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA) e mantida seguindo os procedimentos padrões de cultivo celular (MORAES *et al.*, 2012). Foi utilizado meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecidos com glicose 5 mM (meio *low glucose*) ou 25 mM (meio *high glucose*). Como suplementação nutritiva foi utilizado soro fetal bovino nas concentrações de 10 % (para cultivo e expansão) ou 1 % (para os experimentos).

3.8.2 QUIMASE DERIVADA DE CÉLULAS VASCULARES E PRODUÇÃO DE ANGIOTENSINA II

Trabalhos anteriores demonstraram que o tratamento de células musculares lisas de aorta em meio hiperglicêmico (contendo glicose 25 mM) induz a expressão de quimase e a produção de angiotensina II (Ang II) (LAVRENTYEV *et al.*, 2007). Neste trabalho utilizamos protocolos semelhantes para estudar os efeitos do CETI. Células A7r5 ($5,5 \times 10^3$ células/poço) cultivadas em meio DMEM contendo 5 mM (meio normoglicêmico) ou 25 mM de glicose (meio hiperglicêmico) foram pré-tratadas com diferentes concentrações do CETI (8, 20, 40 nM) ou PBS por 12, 24 ou 48 h na presença de soro fetal bovino 1 %. A cada 12 h 50 % do meio de cultura foi repostado para manter constante a concentração de glicose no meio. A pressão osmótica do meio foi normalizada em todos os grupos de tratamento pela adição de manitol. Após os diferentes tempos, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas duas vezes e lisadas em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 2M NaCl. A atividade da quimase intracelular foi medida de acordo com protocolo descrito no item 3.4 após adição do substrato Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida. Os níveis intracelulares de Ang II foram determinados por enzima-imunoensaio seguindo as recomendações do fabricante (rat angiotensin II ELISA kit CSB-E04494r, CUSABIO Technology).

3.8.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de *Wound Healing*, que consiste na confecção de uma lesão na camada unicelular, de dimensões fixas, com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o assoalho do poço da placa de cultura. Resumidamente, VSMC da linhagem A7r5 ($5,5 \times 10^3$ células/poço) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em meio normoglicêmico (glicose 5 mM) e hiperglicêmico (glicose 25 mM), após aproximadamente 80 % do crescimento confluyente das células foi feita uma fenda no centro da placa com uma ponteira amarela estéril. Em seguida, as VSMC foram tratadas com CETI 40 nM ou PBS e mantidas em DMEM contendo 1% de FCS e incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Imagens de cada uma das fendas foram capturadas no início (tempo zero) e após 24 h usando um microscópio óptico Nikon Eclipse TE 2000 U. As áreas claras foram medidas e comparadas usando o software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.8.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E CITOTOXICIDADE

A proliferação de VSMC foi avaliada pelo MTT (3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio). As células foram cultivadas *overnight* em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço usando um meio DMEM contendo 10% de FCS. As células foram lavadas duas vezes em PBS, o meio foi substituído por DMEM contendo 1% de FCS e glicose nas concentrações de 5 ou 25 mM. As culturas foram tratadas com diferentes concentrações de CETI (2, 5, 10, 55, 110, 558 nM) ou PBS. Após 24 h de incubação a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio foi removido e a solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada a cada poço, seguida de incubação por 4 horas. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em dimetilsulfóxido (100 µL) e a absorbância foi determinada (565 nm). Os resultados foram expressos comparando células tratadas com PBS com células tratadas com CETI em condições normoglicêmica e hiperglicêmica. Para verificar os efeitos citotóxicos diretos do CETI o meio de cultura foi coletado para dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) através do kit MAK066 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

3.8.5 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

VSMC A7r5 ($5,5 \times 10^3$ células/poço) foram cultivadas na presença de glicose nas concentrações de 5 ou 25 mM e tratadas com PBS ou CETI (8, 20, 40 nM) por 24h à 37°C/ 5% CO₂ em placas pretas de 96 poços. A produção de ROS intracelular foi determinada por fluorimetria através da oxidação da sonda H2DCFDA (10 µM) em spectraMAX M5 (Molecular

Devices, Sunnyvale, CA) com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm (MORAES *et al.*, 2017). A produção do ânion superóxido foi estimada em experimento semelhante após a coleta das células e incubação com NBT (*Nitroblue Tetrazolium*), seguindo protocolo já descrito anteriormente (HOHMANN *et al.*, 2013).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão dos diferentes parâmetros avaliados. Diferenças entre os grupos experimentais foram verificadas pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de testes post-hoc adequados. Em todas as comparações, valores de *P* menores que 0,05 indicaram diferenças significativas. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc USA).

4. RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Um extrato bruto de proteínas foi obtido diretamente das sementes de *Canavalia ensiformis* maceradas em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Na sequência foi realizado um primeiro fracionamento com sulfato de amônio (até 30 % de saturação) e uma etapa cromatográfica de troca aniônica em Q-sepharose. As frações que apresentaram atividade inibitória sobre tripsina foram eluídas com 0,2 M de NaCl, combinadas, ultrafiltradas em Amicon (*cutoff* de 30 kDa) e aplicadas em uma segunda etapa cromatográfica em tripsina-sepharose (Fig. 7). Nessa etapa cromatográfica, uma série de proteínas sem afinidade por tripsina foram eluídas nas primeiras frações, enquanto aquelas com capacidade de se ligarem em tripsina foram eluídas após a mudança brusca de pH pela adição de HCl 100 mM (linha azul Fig. 7). As frações eluídas em meio ácido foram neutralizadas em 1M Tris-HCl, pH 8,0, concentradas e a capacidade inibitória sobre tripsina foi confirmada em ensaio cinético com substrato N-Benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) (linha vermelha Fig. 7).

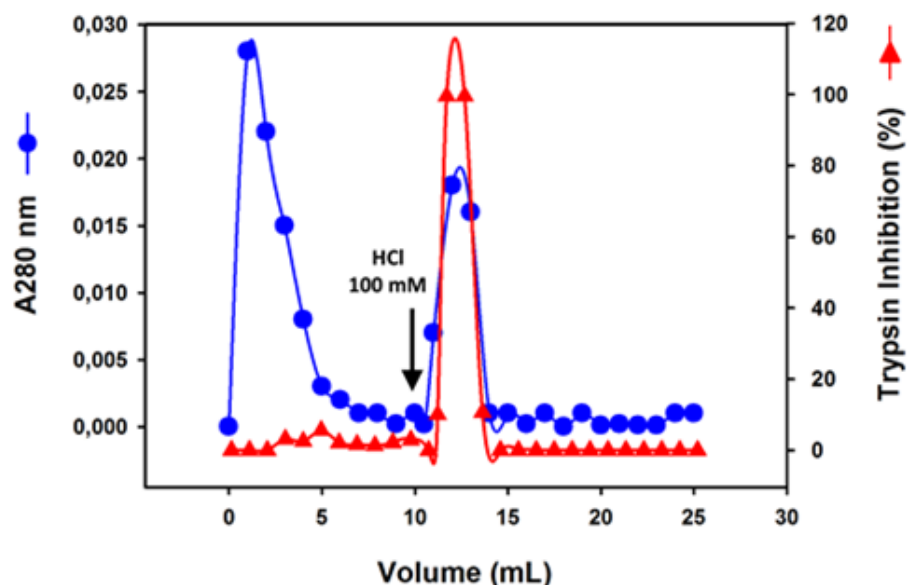


Figura 7. Isolamento do CETI (*Canavalia ensiformis* trypsin inhibitor) por cromatografia de afinidade em tripsina-sepharose. Após extração em meio aquoso, precipitação com sulfato de amônio e uma primeira etapa cromatográfica de troca aniônica, as frações enriquecidas no inibidor foram aplicadas em uma resina de afinidade com tripsina-sepharose. O CETI purificado foi eluído após redução do pH com HCl 100 mM (seta preta). A eluição das proteínas foi acompanhada pela absorbância à 280 nm e a capacidade inibitória sobre tripsina foi avaliada em ensaio cinético com substrato N-Benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA).

O grau de pureza da preparação obtida da tripsina-sepharose foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas. Em condições desnaturantes, na presença de SDS (SDS-PAGE), a preparação apresentou-se homogênea com uma banda simples de massa molecular menor que 10 kDa em um gel de gradiente (6-20 %) (**Fig 8A**, coluna 1). A adição de agente redutor (2-mercaptoetanol) não alterou de maneira significativa o padrão de migração da molécula, indicando ser esta de cadeia simples (**Fig 8A**, coluna 2). Em condições não-desnaturantes, na ausência de SDS (Nu-PAGE), novamente uma banda simples foi observada, mas com massa molecular correspondendo à 24-25 kDa (**Fig. 8B**, coluna 1). Da mesma forma, o padrão de migração não foi alterado na presença do agente redutor (**Fig. 8B**, coluna 2). A análise por MALDI-TOF confirmou os dados obtidos por eletroforese e a homogeneidade da preparação (**Fig. 8C**). A massa molecular do monômero da molécula isolada foi de 8.173,21 Da e ela é provavelmente um trímero em solução (**Fig. 8C**). A nova molécula obtida foi nomeada de CETI (*Canavalia ensiformes* *Tripsin* *Inhibitor*).

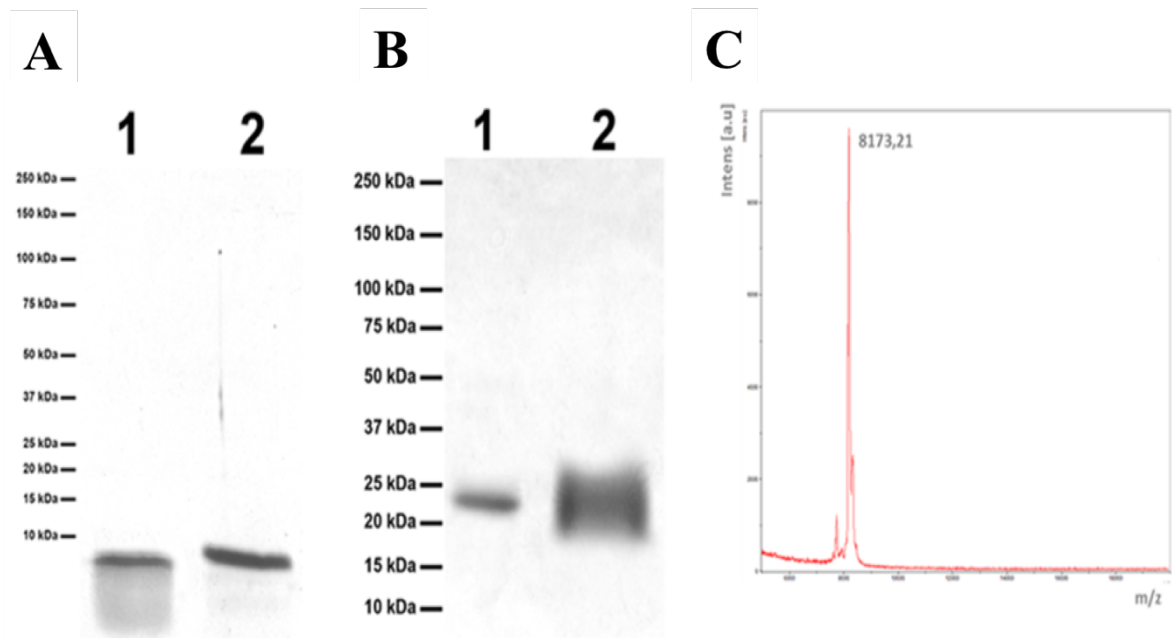


Figura 8. Análise das frações da tripsina-sepharose por eletroforese e espectrometria de massas. **A.** A fração obtida da tripsina-sepharose (5 µg) foi aplicada em um gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 6-20%). Coluna 1: Amostra em condições não redutoras (na ausência de 2-mercaptoetanol); Coluna 2: Amostra em condições redutoras (na presença de 2-mercaptoetanol) **B.** De forma semelhante, a fração obtida da tripsina-sepharose (5 µg) foi aplicada em um gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (Nu-PAGE 6-20%). Coluna 1: Amostra em condições não redutoras (na ausência de 2-mercaptoetanol); Coluna 2: Amostra em condições redutoras (na presença de 2-mercaptoetanol). **C.** A massa molecular e a pureza do inibidor isolado foi analisada por MALDI-TOF.

Para obtenção da sequência de aminoácidos, o CETI foi submetido à digestão enzimática e os fragmentos foram analisados por espectrometria de massas em um LTQ-XL-Orbitrap (**Fig. 9**). A sequência completa do CETI apresentou 76 aminoácidos (**Fig. 9A**). Trata-se de um peptídeo de cadeia simples, rico em cisteínas (9 resíduos) e apresenta alta homologia de sequência com vários inibidores da família do tipo Bowman-Birk que são comumente encontrados em sementes de leguminosas. Possui duas alças inibitórias (de cerca de 10 resíduos de aminoácidos cada) com capacidade para interação com duas proteases diferentes. A primeira alça (alça 1 em vermelho na figura) possui uma lisina na posição P1 (seta rosa) e uma serina na posição P1' (seta verde) e a segunda alça (alça 2 em azul na figura) possui uma leucina na posição P1 (seta azul claro) e uma serina na posição P1' (seta laranja) (**Fig. 9A**). De uma maneira geral, são os aminoácidos nas posições P1-P1' de cada alça que determinam a especificidade do inibidor do tipo Bowman-Birk. O CETI possui especificidade de ligação para tripsina na alça 1 (lisina-serina em P1-P1') e para quimase na alça 2 (leucina-serina em P1-P1'). A grande maioria de outros inibidores isolados dessa classe apresentam na segunda alça especificidade para ligação de quimotripsina (tirosina ou fenilalanina em P1 e serina em P1') ou para ligação de uma segunda molécula de tripsina (lisina ou arginina em P1 e serina em P1') (**Fig. 9A**). Como os inibidores Bowman-Birk possuem uma estrutura molecular conservada foi possível obter a estrutura secundária tridimensional do CETI por homologia à estrutura cristalográfica do inibidor de sementes de soja (sp|P01055|IBB1_SOYBN) (**Fig. 9B**), o que deixou evidente as duas alças reativas e a região de ligação das enzimas (**Fig. 9C**).

O CETI demonstrou ampla estabilidade térmica e resistência às variações de pH e presença de agentes redutores (**Fig. 10**). O CETI manteve a capacidade inibitória sobre tripsina acima de 80 % mesmo após incubação em temperaturas entre 80-100 °C, demonstrando ter uma estrutura secundária muito estável (**Fig. 10A**). De forma semelhante, a molécula mostrou-se resistente à amplas variações de pH do meio (2,2 – 10), mantendo a atividade inibitória (**Fig. 10B**). Após incubação com o agente redutor DTT houve redução na atividade inibitória em concentrações de 0,8-1 mM do agente, no entanto mesmo assim a capacidade inibitória manteve-se acima de 50 % (**Fig. 10C**).

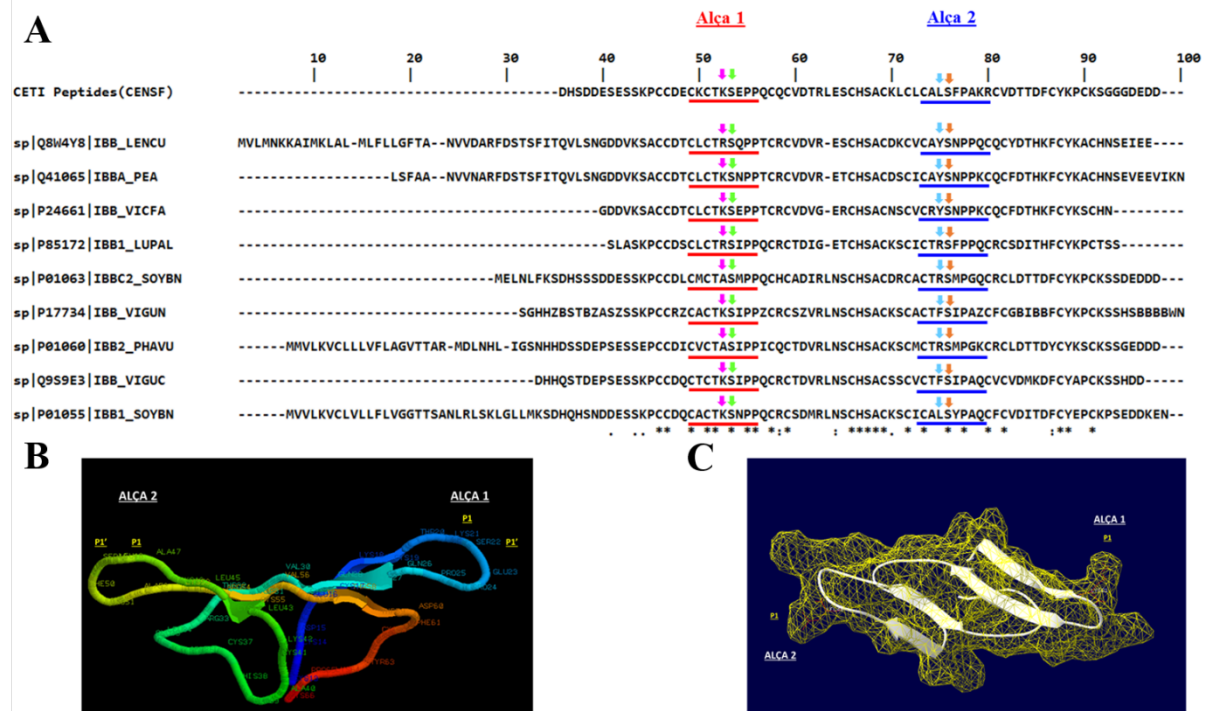


Figura 9. Caracterização estrutural do inibidor de *C. ensiformis*. **A.** A sequência primária do CETI foi obtida por espectrometria de massas após digestão enzimática e análise dos fragmentos em um sistema LTQ-XL-Orbitrap. A sequência de aminoácidos assim obtida foi alinhada com outras de inibidores da mesma classe obtidos de leguminosas. Estão assinaladas em vermelho e azul, respectivamente, as sequências das alças 1 e 2 que conferem a capacidade de ligação a duas proteases. As setas rosa e verde assinalam respectivamente os resíduos em P1 e P1' da alça 1 de cada inibidor. As setas azul claro e laranja assinalam respectivamente os resíduos em P1 e P1' da alça 2 de cada inibidor. Os asteriscos (*) indicam resíduos idênticos em todos os peptídeos. **B.** Modelo da estrutura tridimensional do CETI obtido por homologia à estrutura cristalográfica do inibidor de sementes de soja (sp|P01055|IBB1_SOYBN). **C.** Estrutura do CETI evidenciando as alças de ligação à tripsina (alça 1) e à quimase (alça 2). Os modelos foram obtidos no SWISS-MODEL (protein structure homology-modelling server, <https://swissmodel.expasy.org/>) e visualizados no Swiss PDB-Viewer.

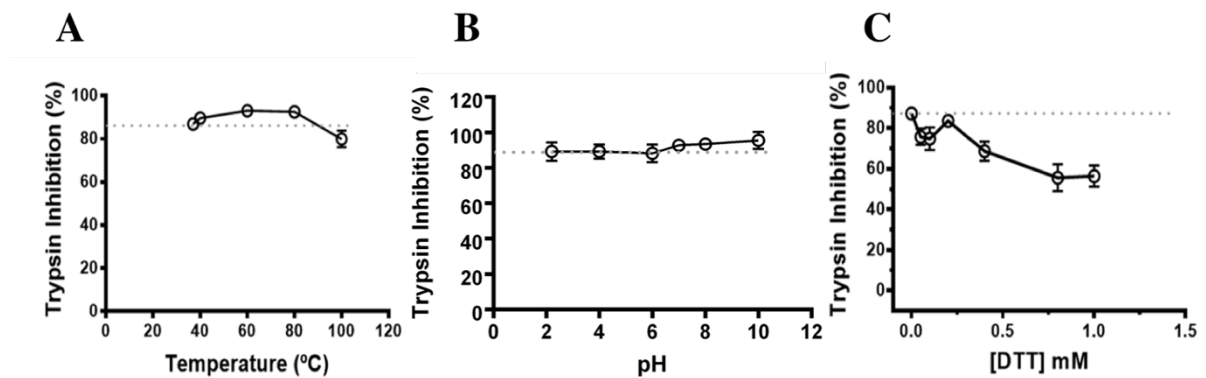


Figura 10. Estabilidade estrutural. **A.** Estabilidade térmica do CETI. O inibidor (70 nM) foi incubado em diferentes temperaturas por 30 min e a atividade inibitória foi medida pela adição de tripsina + substrato BAPNA. **B.** Estabilidade a pH do CETI. O inibidor (70 nM) foi incubado em diferentes pH por 30 min a 37°C e a atividade inibitória foi medida pela adição de tripsina + substrato BAPNA. **C.** Estabilidade de agente redutor. CETI (70 nM) foi incubado com diferentes concentrações de DTT por 30 min e a atividade inibitória foi medida pela adição de tripsina + substrato BAPNA.

4.2 ESPECIFICIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE INIBIÇÃO

A capacidade inibitória do CETI foi também testada frente a diferentes serino-proteínases que são comumente conhecidas por serem alvos dos inibidores do tipo Bowman-Birk, entre elas elastase, quimotripsina, trombina, calicreína, fator Xa, plasmina, além de tripsina e quimase. O *screening* demonstrou que o CETI é específico para tripsina e quimase (**Fig. 11**). A partir destes resultados a caracterização inibitória e a cinética enzimática foi realizada para essas duas enzimas.

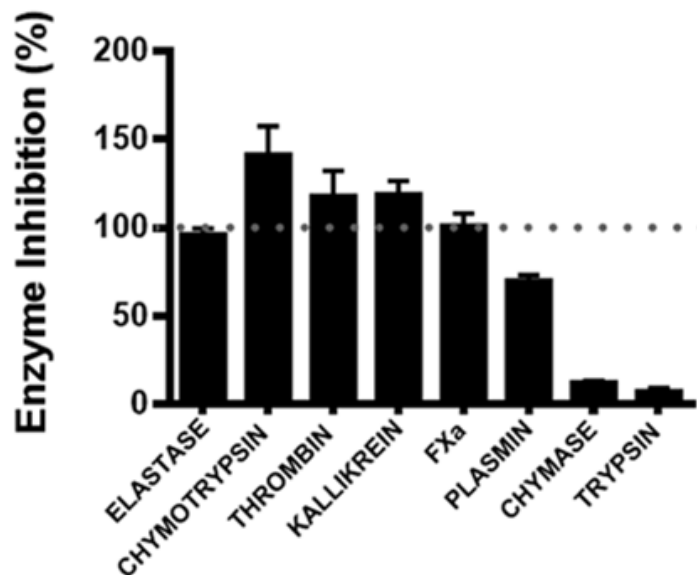


Figura 11. Capacidade inibitória do CETI sobre diferentes serino-proteínases. O CETI (140 nM) foi incubado com diferentes serino-proteínases (40 nM) e a atividade enzimática residual de cada uma foi avaliada pela adição de substratos cromogênicos sintéticos específicos para cada enzima.

O CETI (0-140 nM) inibi a ação proteolítica da tripsina sobre o substrato sintético BAPNA de maneira dose-dependente (**Fig. 12**). Como é possível observar na **Fig. 12A**, a tripsina perde progressivamente a sua capacidade de gerar *p*-nitroanilina na presença do CETI. Quando a atividade residual da enzima foi plotada versus a relação molar de inibidor/enzima a tangente à curva toca o eixo x no valor aproximado de 1, sugerindo que a estequiometria de ligação inibidor-enzima é de 1:1 (**Fig. 12B**). Da mesma forma, quando a atividade residual de tripsina foi plotada versus a concentração do inibidor, a concentração capaz de bloquear cerca de 50 % da atividade da enzima (IC₅₀) foi de 21,68 nM (**Fig. 12C**).

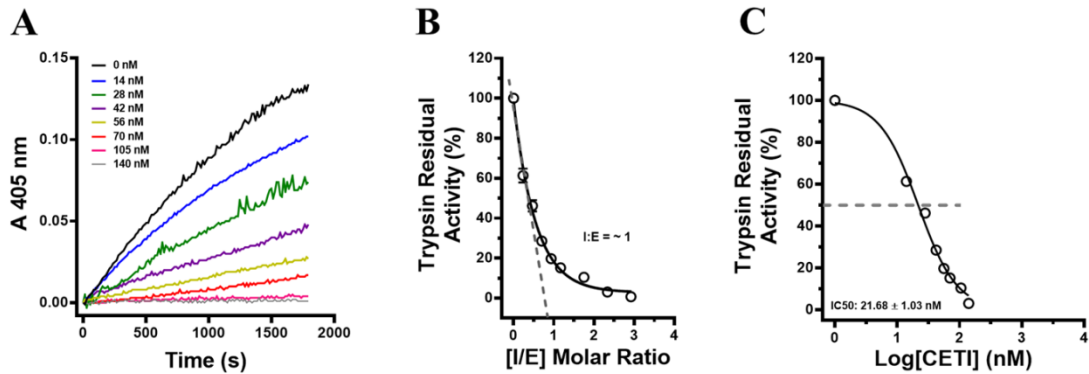


Figura 12. CETI inibe tripsina de maneira dose-dependente. **A.** Representação da cinética de inibição da tripsina. Diferentes concentrações do CETI (0-140 nM) foram pré-incubadas com tripsina e a reação foi disparada pela adição do substrato BAPNA (N-Benzoil-DL-Arg-*p*-nitroanilida). **B.** Estequiometria da interação CETI-tripsina. **C.** Curva dose-resposta de inibição de tripsina.

O inibidor teve ação independente do tempo de incubação para bloquear a atividade da tripsina (**Fig. 13A**). Plotando os valores da razão entre a velocidade na presença (V_s) e ausência (V_o) de inibidor versus a concentração do CETI para diferentes doses de tripsina (**Fig. 13B**), observa-se que o IC₅₀ do inibidor varia de forma diretamente proporcional ao aumento na concentração de enzima (**Fig. 13C**), o que indica que o CETI é um inibidor não-clássico para tripsina e, portanto, não segue o modelo matemático das equações de Michaelis-Menten. Pelo mesmo gráfico foi possível obter uma estimativa do valor da constante de inibição aparente (K_{iapp}) para tripsina que foi de 5,486 nM. Tratando-se de um inibidor não-clássico, os dados de velocidade de reação na presença do inibidor versus diferentes concentrações de substrato não puderam ser analisados seguindo o método usual de Lineweaver-Burke. Dessa forma, os dados foram analisados segundo as equações da cinética de Morrison utilizada para inibidores não clássicos (**Fig. 13D**), onde foi obtida uma relação inversamente proporcional entre o IC₅₀ do inibidor e a concentração de substrato, indicando ser este, um inibidor não-competitivo para tripsina (**Fig. 13E**). Este tipo de inibição caracteriza-se não somente pela formação de um intermediário estável inibidor-enzima, como para os inibidores competitivos clássicos, mas também pela formação de um intermediário inibidor-enzima-substrato (**Fig. 13F**).

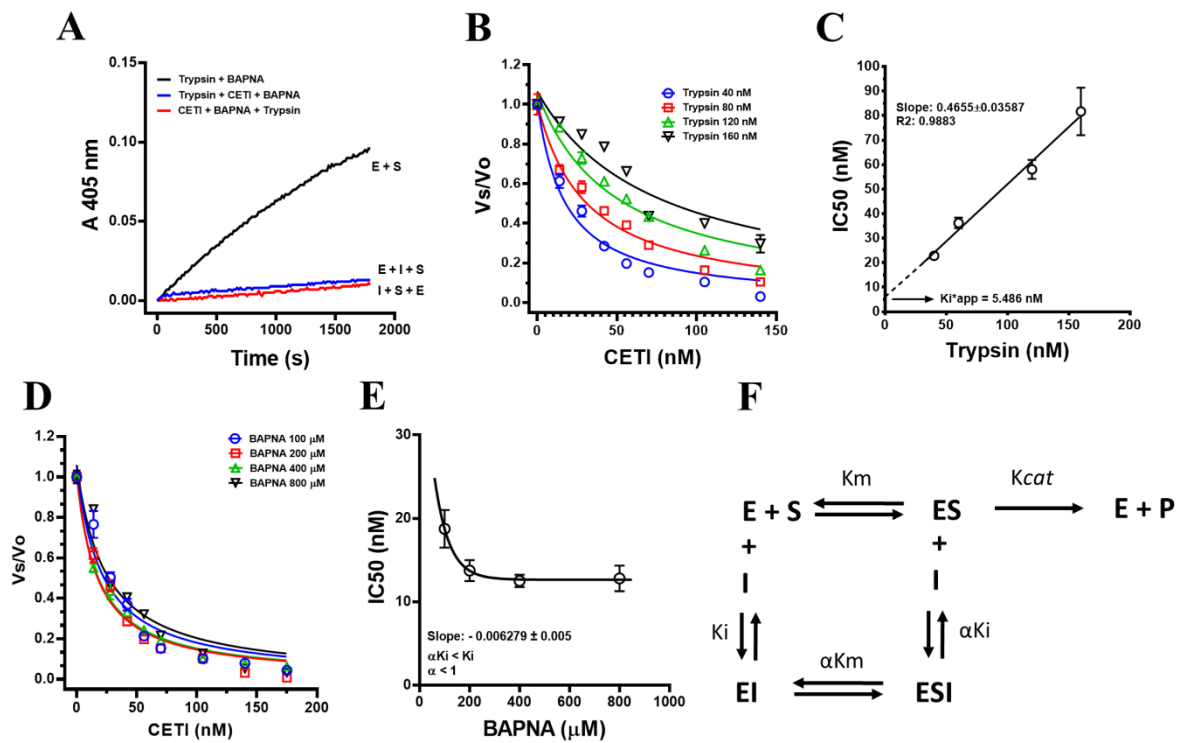


Figura 13. Modelo cinético de inibição de tripsina. A. CETI inibe tripsina independente de incubação prévia inibidor + enzima. No gráfico E: enzima; I: inibidor; S: substrato. B. Razão da velocidade de reação na presença do inibidor (V_s) pela velocidade na ausência de inibidor (V_o) com diferentes concentrações de tripsina. C. Variação do IC_{50} pela concentração de tripsina. Notar a relação direta entre os valores de IC_{50} e a concentração de tripsina, indicando que CETI é um inibidor não-clássico. No gráfico K_i^{app} : Constante de inibição aparente. D. Gráfico de Morrison em diferentes concentrações de substrato. E. Gráfico do IC_{50} (obtido pelas equações de Morrison) versus a concentração de substrato BAPNA. Notar o perfil da curva (com inclinação negativa, relação inversamente proporcional entre IC_{50} vs [substrato]), indicando inibição não-competitiva F. Esquema de inibição CETI-tripsina (inibição não-competitiva).

Na sequência, ensaios semelhantes foram realizados para a caracterização da cinética de inibição de quimase. O CETI (0-250 nM) inibi a ação proteolítica da quimase sobre o substrato sintético Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (AAPF-PNA) de maneira dose-dependente (**Fig. 14**). Como é possível observar na **Fig. 14A**, a quimase perde progressivamente a sua capacidade de gerar *p*-nitroanilina na presença do CETI. Quando a atividade residual da enzima foi plotada versus a relação molar de inibidor/enzima a tangente à curva toca o eixo x no valor aproximado de 2, sugerindo que a estequiometria de ligação inibidor-enzima é de 2:1 (**Fig. 14B**). Da mesma forma, quando a atividade residual de quimase foi plotada versus a concentração do inibidor, a concentração capaz de bloquear cerca de 50 % da atividade da enzima (IC_{50}) foi de 13,8 nM (**Fig. 14C**).

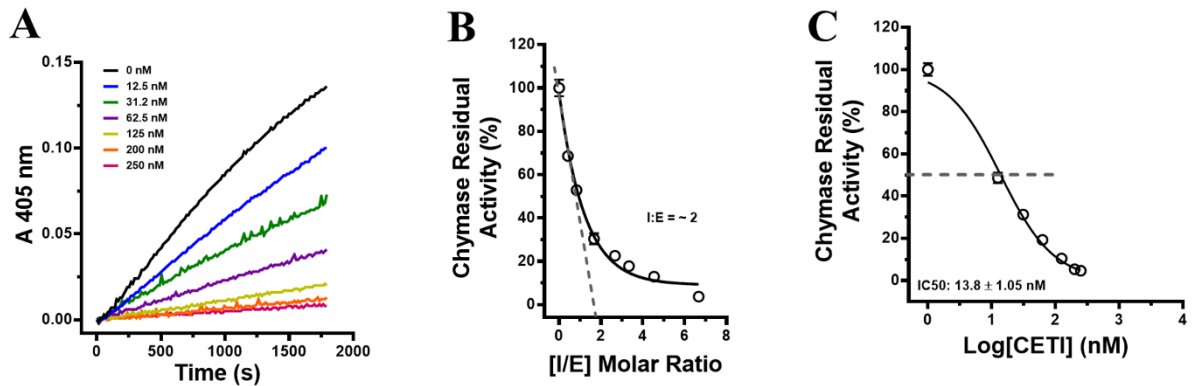


Figura 14. CETI inibe quimase de maneira dose-dependente. **A.** Representação da cinética de inibição da quimase. Diferentes concentrações do CETI (0-250 nM) foram pré-incubadas com quimase e a reação foi disparada pela adição do substrato AAPF-PNA (Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida). **B.** Estequiometria da interação CETI-quimase. **C.** Curva dose-resposta de inibição de quimase.

Diferente do observado para tripsina, o CETI teve sua ação inibitória influenciada pelo tempo de incubação com a quimase, mostrando um perfil enzimático tempo-dependente (**Fig. 15A**). Plotando os valores da razão entre a velocidade na presença (V_s) e ausência (V_o) de inibidor versus a concentração do CETI para diferentes doses de quimase (**Fig. 15B**), observa-se que o IC_{50} do inibidor não se altera com o aumento na concentração de enzima (**Fig. 15C**), o que indica que o CETI é um inibidor clássico para quimase e, portanto, segue o modelo matemático das equações de Michaelis-Menten. Tratando-se de um inibidor clássico, os dados de velocidade de reação na presença do inibidor versus diferentes concentrações de substrato foram analisados seguindo o método usual de Lineweaver-Burke. A **Fig. 15D** demonstra o perfil clássico de inibição competitiva para quimase, onde o aumento da concentração de substrato compete pelo sítio ativo da enzima e enfraquece a interação enzima-inibidor reduzindo a sua atividade inibitória. Plotando a inclinação de cada uma das retas de velocidade versus a concentração do substrato (inclinação das retas da Fig. 15D) pela concentração de CETI, obteve-se uma relação linear direta onde a intersecção com o eixo x indicou um K_i de 14,42 nM (**Fig. 15E**). Neste tipo de inibição há a formação de um intermediário estável inibidor-enzima típico do mecanismo de inibidores competitivos (**Fig. 15F**).

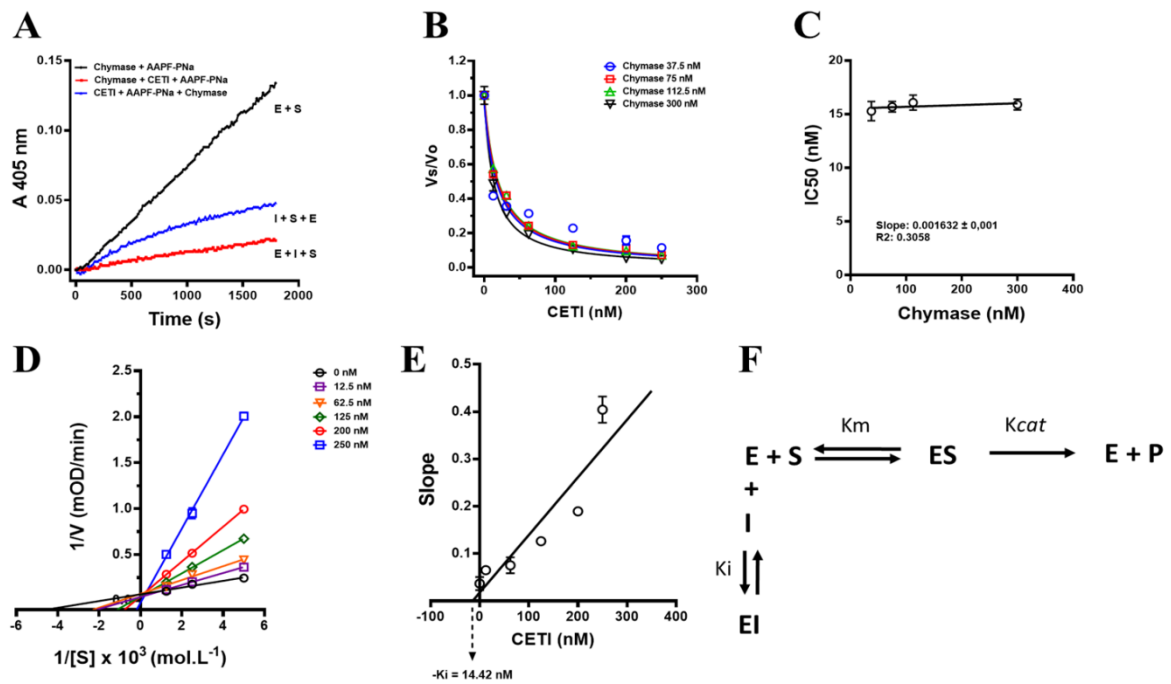


Figura 15. Modelo cinético de inibição de quimase. **A.** CETI inibe quimase de forma dependente de incubação prévia inibidor + enzima. No gráfico E: enzima; I: inibidor; S: substrato. **B.** Razão da velocidade de reação na presença do inibidor (V_s) pela velocidade na ausência de inibidor (V_o) com diferentes concentrações de quimase. **C.** Variação do IC50 pela concentração de quimase. Notar que os valores de IC50 não variam de acordo com a concentração de quimase, indicando que CETI é um inibidor clássico. **D.** Gráfico de Lineweaver-Burk em diferentes concentrações de substrato indicando que CETI é um inibidor competitivo de quimase. **E.** Regressão linear da inclinação de cada uma das retas (obtidas pelo gráfico de Lineweaver-Burk) versus a concentração de inibidor para obtenção do K_i verdadeiro. No gráfico: K_i , constante de inibição. **F.** Esquema de inibição CETI-quimase (inibição competitiva).

4.3 EFEITOS DO CETI SOBRE A GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA II POR QUIMASE HUMANA

Os efeitos do CETI sobre a geração de angiotensina II (Ang II) por quimase humana foram verificados por espectrometria de massas. Como até o momento foram utilizados somente os substratos sintéticos para a caracterização da atividade inibitória, nesse experimento utilizamos a quimase de origem humana (CMA1) e seu substrato natural, a angiotensina I (Ang I). A quimase interage com a Ang I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu, MW 1.296 Da) e cliva na ligação Phe-His liberando o dipeptídeo (His-Leu) gerando a Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, MW 1.046 Da). Na **Fig. 16** é possível observar que o CETI bloqueia de forma dose-dependente a formação do pico de 1.046,550 Da que corresponde à Ang II. Portanto, o CETI é capaz de bloquear a quimase humana CMA1 inibindo a clivagem do seu substrato natural e a consequente geração de Ang II.

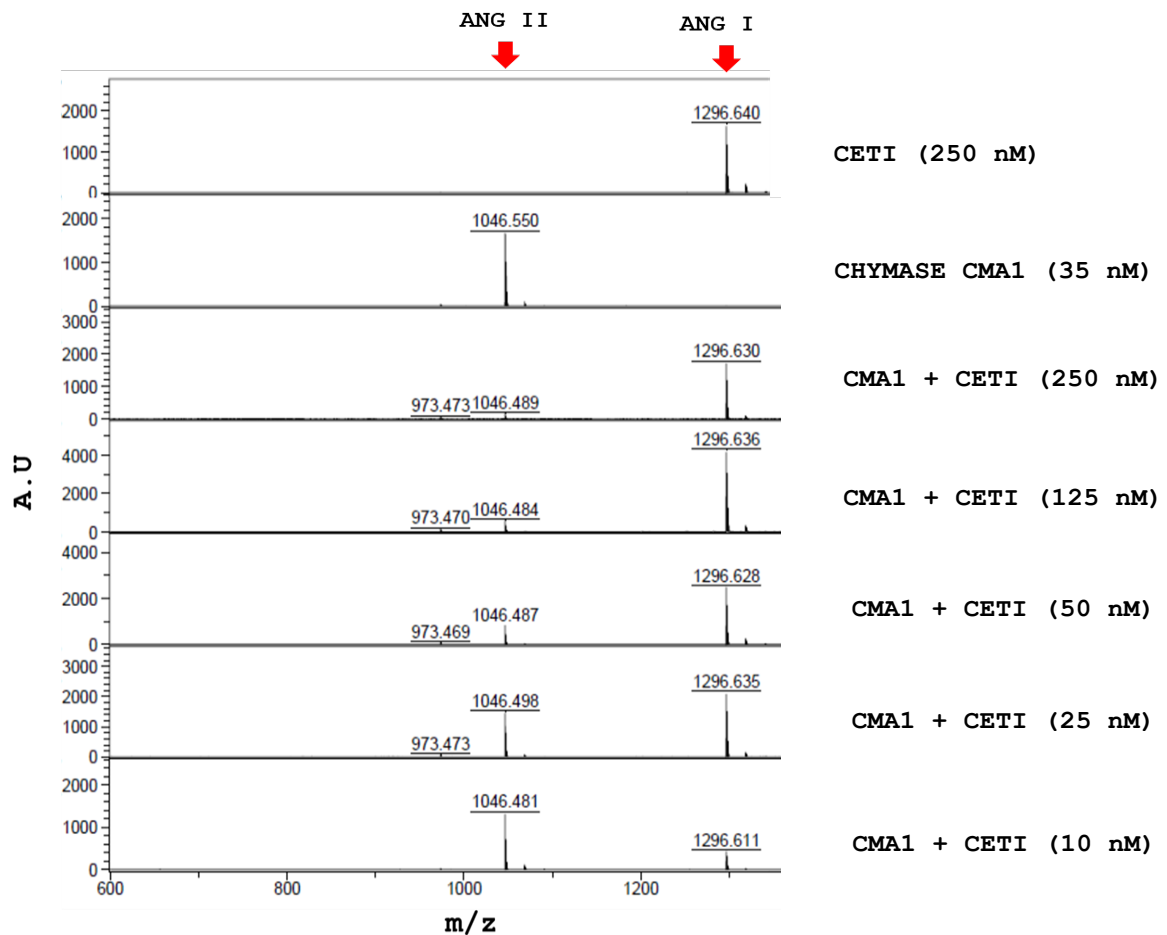


Figura 16. CETI inibe a geração de angiotensina II por quimase humana. Quimase humana (CMA1) foi incubada com angiotensina I na presença ou ausência de diferentes concentrações de CETI. Os fragmentos gerados foram então analisados por espectrometria de massas.

4.4 EFEITOS DO CETI SOBRE QUIMASE DE MASTÓCITOS E PERMEABILIDADE VASCULAR *IN VIVO*

A quimase é expressa principalmente em células do sistema vascular e renal, mas também se encontra concentrada e estocada nos grânulos de mastócitos, que são células conhecidas por sua participação em processos inflamatórios. Nos próximos experimentos, isolamos mastócitos peritoneais de ratos para estudar o potencial inibitório e anti-inflamatório do CETI. Primeiramente uma resposta inflamatória aguda foi induzida em ratos Wistar machos através de uma injeção intraperitoneal de carragenina e um concentrado de mastócitos foi isolado e purificado. A partir desses mastócitos foi preparado um extrato e incubado com diferentes concentrações do CETI. A **Fig. 17A** mostra que o CETI foi capaz de inibir significativamente a atividade do tipo-quimase dos mastócitos peritoneais de ratos. Essa atividade foi confirmada em um zimograma copolimerizado com caseína (**Fig. 17B**), onde, na

ausência do CETI, pode-se observar uma banda clara (coluna 1 da **Fig. 17B**) correspondente à atividade da quimase de mastócitos que consumiu o substrato (caseína) copolimerizado no gel. Já na coluna 2 (**Fig 17B**), na presença do CETI, essa mesma banda desaparece, indicando que a quimase de mastócitos foi inibida.

A degranulação *in vivo* de mastócitos é um evento pró-inflamatório que induz o aumento de permeabilidade vascular e edema. A permeabilidade vascular pode facilmente ser avaliada *in vivo* pelo extravasamento do corante azul de evans que se liga à albumina circulante e, em resposta a um estímulo pró-inflamatório, extravasa para o tecido. O CETI foi capaz de reduzir significativamente o aumento de permeabilidade e o extravasamento vascular local quando co-injetado por via intradérmica no dorso de ratos com o composto 48/80, um indutor da degranulação de mastócitos (**Fig. 17C**). Vale observar que o CETI por si só não foi capaz de induzir resposta inflamatória alguma e não alterou o extravasamento vascular (**Fig. 17C**), o que denota o potencial anti-inflamatório e antiedematogênico do CETI, principalmente por bloquear a ação de mastócitos.

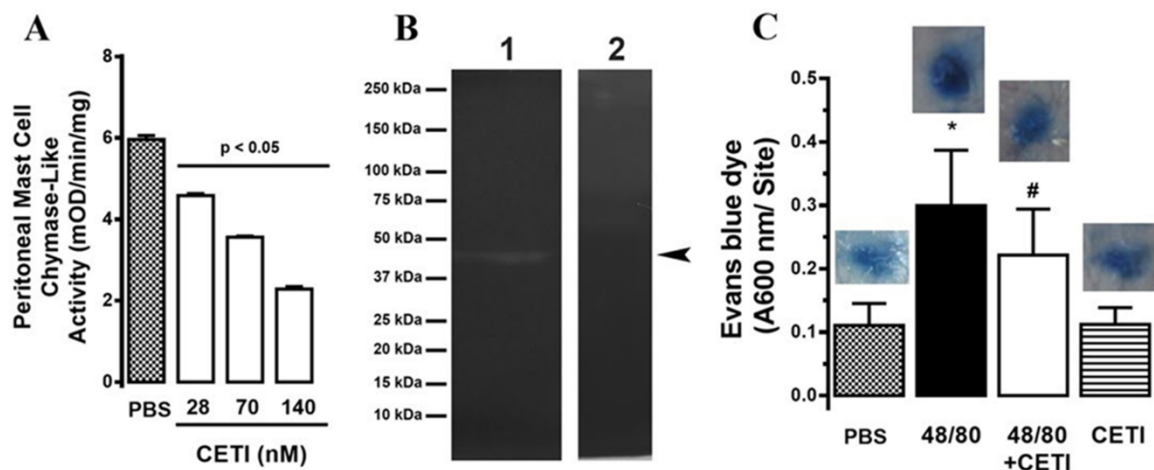


Figura 17. CETI inibe quimase secretada por mastócitos isolados do peritônio de ratos e reduz a permeabilidade vascular *in vivo*. **A.** CETI inibe de maneira dose-dependente a atividade tipo-quimase de um extrato preparado a partir de mastócitos isolados do peritônio de ratos previamente estimulados pela injeção de carragenina (i.p). **B.** A atividade proteolítica da quimase obtida dos mastócitos peritoneais foi detectada em zimograma de caseína. *Coluna 1:* extrato de mastócitos peritoneais; *Coluna 2:* extrato de mastócitos + CETI (80 nM). **C.** CETI inibe o aumento da permeabilidade vascular induzida *in vivo* pela injeção do composto 48/80, um degranulador de mastócitos. A permeabilidade vascular foi avaliada pelo extravasamento do corante azul de evans que se liga à albumina circulante e, em resposta a um estímulo pró-inflamatório, extravasa para o tecido. Após injeção intradérmica dos estímulos (PBS, 10 µg 48/80 ou 10 µg 48/80+ 3 µg CETI e 3 µg CETI) no dorso dos animais, a quantidade de corante extravasado no local da injeção foi quantificada por espectrofotometria. * $p < 0.05$ vs PBS; # $p < 0.05$ vs 48/80.

4.5 ENSAIOS *IN-VITRO* COM QUIMASE DE CÉLULAS VASCULARES

Alguns dados da literatura mostram que a expressão de quimase e a produção de Ang II aumentam em células musculares lisas de aorta (VSMC, do inglês, *vascular smooth muscle cell*) quando cultivadas em meio hiperglicêmico, mimetizando as condições encontradas no diabetes (LAVRENTYEV *et al.*, 2007). Com o objetivo de investigar os potenciais efeitos citoprotetores do CETI, VSMCs da linhagem A7r5 foram cultivadas em meio normo (glicose 5 mM) e hiperglicêmico (glicose 25 mM) e tratadas com diferentes concentrações do inibidor. Confirmando os dados na literatura, o meio de cultivo hiperglicêmico foi capaz de induzir o aumento da atividade intracelular de quimase (**Fig. 18A**). Esse aumento atingiu um pico em 24 h de cultivo. Da mesma forma, correspondendo ao aumento de atividade de quimase, também houve um aumento na geração intracelular de Ang II nas A7r5 cultivadas com 25 mM de glicose após 24 e 48 h (**Fig. 18B**). Nas células cultivadas em meio normoglicêmico a geração de Ang II manteve-se constante (**Fig. 18B**). Quando as VSMC cultivadas em meio hiperglicêmico por 24 h foram tratadas com CETI (8, 20 ou 40 nM) observou-se uma redução significativa tanto da atividade da quimase intracelular (**Fig. 19A**), quanto da geração de Ang II (**Fig. 19B**).

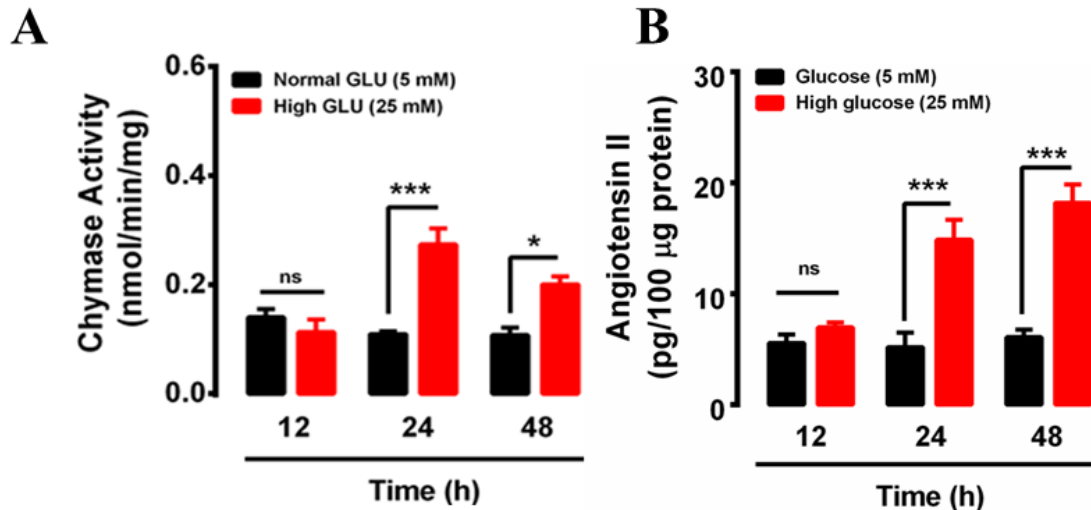


Figura 18. O meio hiperglicêmico induz a atividade de quimase em células vasculares de aorta e a aumenta a geração de Ang II. **A.** Células da musculatura lisa vascular de aorta de rato (VSMCs) da linhagem A7r5 foram cultivadas em meio normo (5 mM glicose) ou hiperglicêmico (25 mM glicose) e a atividade de quimase foi medida pela adição do substrato AAPF-PNA após diferentes tempos de cultivo. **B.** Concentração de Angiotensina II (Ang II) de VSMCs cultivadas em meio normo ou hiperglicêmico após diferentes tempos. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

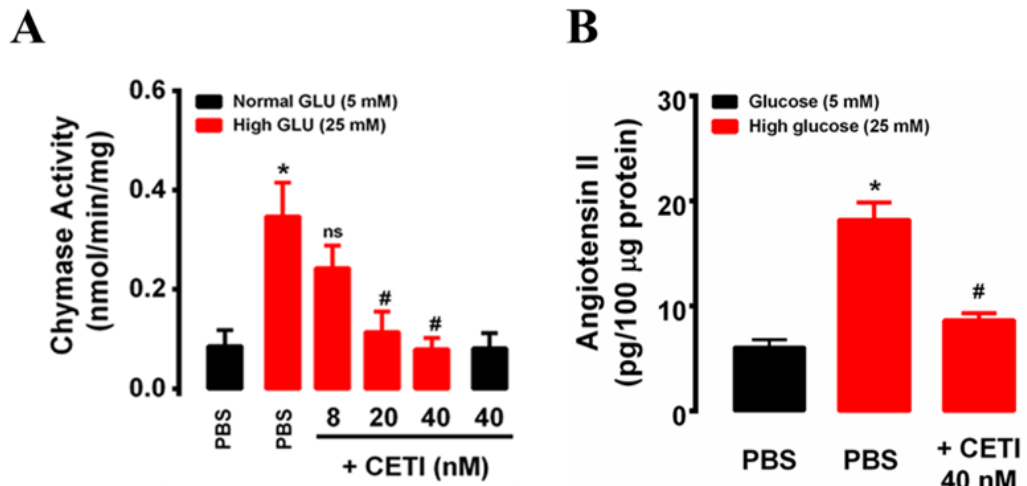


Figura 19. O CETI reduz a atividade da quimase e a geração de Ang II intracelular em VSMCs cultivadas em meio hiperglicêmico. **A.** VSMCs da linhagem A7r5 cultivadas em meio normo (glicose 5 mM) ou hiperglicêmico (glicose 25 mM) foram tratadas com PBS ou CETI em diferentes concentrações por 24 h, as células foram lisadas em 50 mM Tris-HCl, 2M NaCl, pH 8,0 e a atividade da quimase foi determinada pela adição do substrato AAPF-PNA. **B.** Os níveis de Ang II também foram determinados após a lise das VSMCs por ELISA. * $p < 0.05$ vs PBS (*normal GLU*); # $p < 0.05$ vs PBS (*High GLU*).

Como os principais efeitos do aumento de Ang II intracelular relacionam-se com o estímulo da proliferação, migração celular e aumento de espécies reativas de oxigênio, buscamos avaliar esses parâmetros em VSMCs cultivadas em meio hiperglicêmico e tratadas com CETI. O meio de cultura contendo 25 mM de glicose induziu de maneira significativa a proliferação das A7r5 e o CETI reduziu esse efeito de maneira dependente da dose (**Fig. 20A**). Vale notar que essa redução da proliferação celular induzida pelo CETI não está associada a um efeito citotóxico, já que a atividade da lactato desidrogenase no meio de cultivo não sofreu nenhuma alteração na presença do inibidor (**Fig. 20B**).

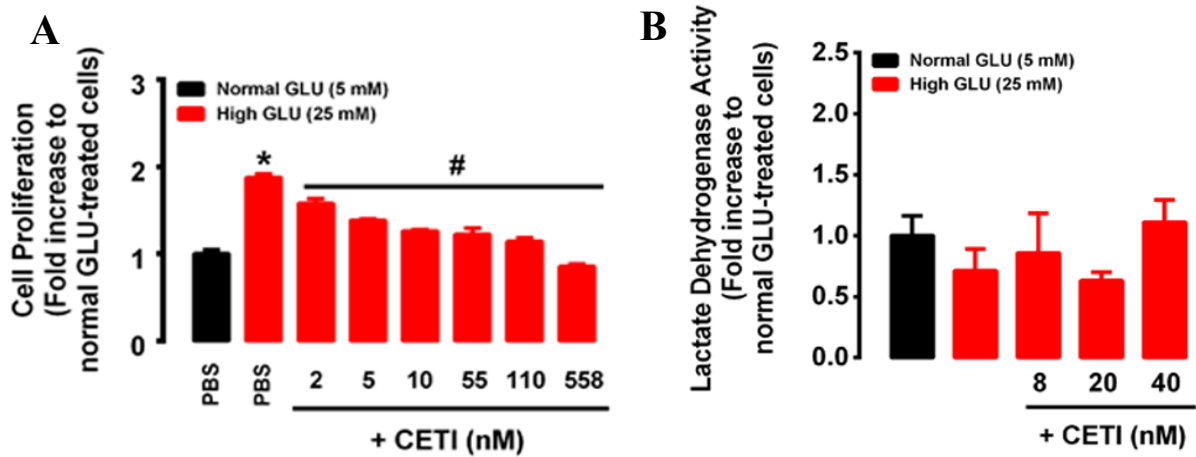


Figura 20. CETI reduz a proliferação celular em meio hiperglicêmico, mas não é tóxico para células vasculares de aorta. A. VSMCs (linhagem A7r5) cultivadas em meio normo (5 mM glicose) ou hiperglicêmico (25 mM glicose) foram tratadas com diferentes concentrações de CETI e a proliferação celular foi estimada pelo ensaio de MTT após 24h. **B.** A toxicidade do CETI sobre as VSMCs cultivadas em meio normo ou hiperglicêmico foi estimada pela dosagem de LDH no sobrenadante de cultura após 24h. * $p < 0.05$ vs PBS (*normal GLU*); # $p < 0.05$ vs PBS (*High GLU*).

Em relação à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o aumento na concentração de glicose de fato induziu os níveis de superóxido (**Fig. 21A**) e a geração de ROS total intracelular (**Fig. 21B**). O tratamento com CETI diminuiu de forma significativa o estresse oxidativo celular no meio hiperglicêmico reduzindo a produção do ânion superóxido, bem como a geração de ROS total avaliado pela oxidação da sonda H2DCFDA no ambiente intracelular (**Fig. 21**). Por fim, a migração celular em meio hiperglicêmico foi avaliada pelo ensaio de *wound healing* onde uma fenda é feita na monocamada confluyente de células e a taxa de migração é avaliada ao longo do tempo na medida em que as células passam novamente a ocupar o espaço da fenda (**Fig. 22A**). Como pode-se observar na **Fig. 22B**, a presença de 25 mM de glicose induz migração e o bloqueio de quimase pelo CETI reduz esse estímulo, indicando que o inibidor pode ser útil em atenuar o eixo proliferação-migração-ROS dependente de Ang II nas condições de hiperglicemia.

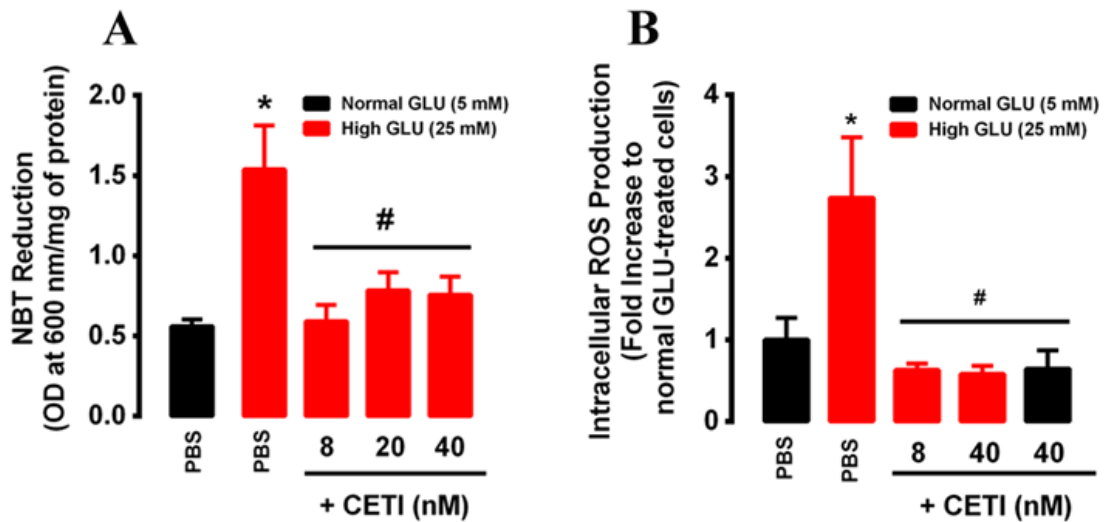


Figura 21. O meio hiperglicêmico induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o CETI reduz esse efeito em células vasculares. **A.** Os níveis de superóxido foram estimados em VSMCs cultivadas em meio normo ou hiperglicêmico tratadas ou não com CETI através da redução de NBT. **B.** A produção de ROS total intracelular foi medida nas VSMCs cultivadas em meio normo ou hiperglicêmico tratadas com PBS ou CETI através da oxidação da sonda fluorescente H2DCFDA após 24h. * $p < 0.05$ vs PBS (*normal GLU*); # $p < 0.05$ vs PBS (*High GLU*).

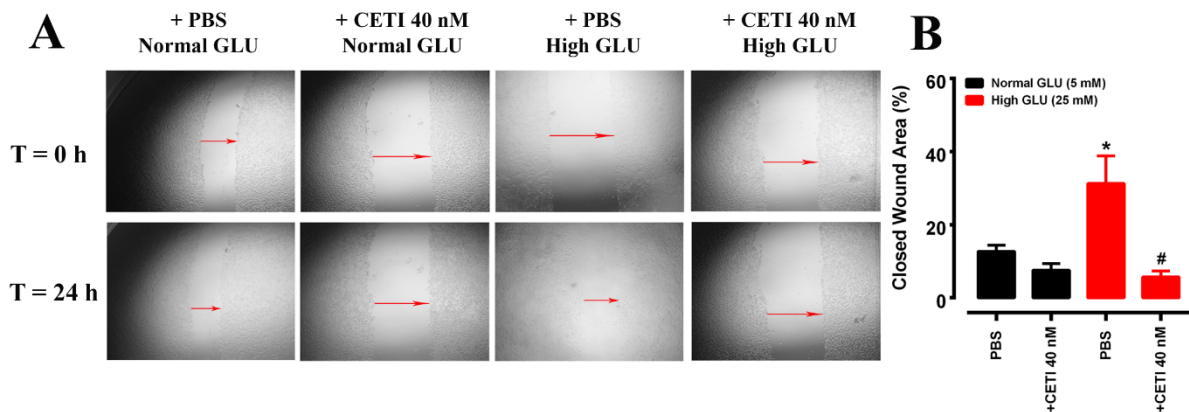


Figura 22. CETI reduz a migração de células vasculares induzida em meio hiperglicêmico. VSMCs (linhagem A7r5) cultivadas em meio normo (5 mM glicose) ou hiperglicêmico (25 mM glicose) foram tratadas com CETI (40 nM) ou PBS e a migração foi estimada pelo ensaio de *wound healing* onde uma fenda é feita na monocamada e a taxa de migração é medida pela área não ocupada pelas células. **A.** Imagens representativas das VSMCs em meio normo ou hiperglicêmico 0 e 24h após o tratamento. **B.** Quantificação da área da fenda ocupada pelas células (estimativa de migração celular). O meio hiperglicêmico induz migração e o bloqueio de quimase pelo CETI reduz esse estímulo. * $p < 0.05$ vs PBS (*normal GLU*); # $p < 0.05$ vs PBS (*High GLU*).

5. DISCUSSÃO

Sementes de leguminosas são enriquecidas em inibidores de proteinases. Uma das classes mais comuns desses inibidores são os do tipo Bowman-Birk (IBB) que bloqueiam especificamente a ação de serino-proteinases (OLIVA & SAMPAIO, 2009). Os IBBs são peptídeos pequenos com massa molecular variando de 8 à 12 kDa e apresentam em sua estrutura duas alças reativas características que permitem interação simultânea com duas proteinases (PRAKASH *et al.*, 1996). Possuem ampla variedade de efeitos biológicos, entre eles ação antimicrobiana, antitumoral e principalmente anti-inflamatória, já demonstrada em modelos clássicos de colite ulcerativa, edema de pata mieloencefalite e esclerose múltipla (WARE *et al.*, 1999; TOUIL *et al.*, 2008; SAFAVI & ROSTAMI, 2012; CLEMENTE & DEL CARMEN ARQUES, 2014; COSTA *et al.*, 2014; SRIKANTH & CHEN, 2016).

Neste trabalho isolamos um novo IBB obtido das sementes de *Canavalia ensiformis*. A molécula foi nomeada CETI e apresentou estrutura homóloga àqueles inibidores da classe dos IBBs, possuindo duas alças reativas, uma capaz de inibir tripsina e outra capaz de inibir quimase. Trata-se de um inibidor rápido, não clássico e não-competitivo para tripsina e um inibidor de ligação tempo-dependente, que segue a cinética clássica de Michaelis-Menten e é competitivo para quimase. O CETI é formado por uma cadeia simples de cerca de 76 aminoácidos, rica em cisteínas e pontes dissulfeto intramoleculares e o seu monômero possui aproximadamente 8 kDa. Aparentemente, em solução aquosa, a estrutura arranja-se na forma de um trímero com cerca de 24 kDa. Devido à presença das pontes dissulfeto, a estrutura é extremamente resistente à desnaturação e degradação térmica e ácida, o que é uma propriedade interessante do ponto de vista de aplicabilidade terapêutica. O CETI é específico para tripsina (através da interação com a alça 1, resíduos Lys-Ser) e para quimase (através da interação com a alça 2, resíduos Leu-Ser), apresentando um K_i de 5,4 e 14,4 nM para tripsina e quimase, respectivamente. O fato de interagir com quimase na segunda alça é um diferencial importante de ser ressaltado, já que a maioria dos outros inibidores da classe apresenta na segunda alça um sítio de interação para outra molécula de tripsina (resíduos Arg ou Lys-Ser) ou quimotripsina (Phe ou Tyr-Ser) (MCBRIDE *et al.*, 2002). É exatamente a existência de um aminoácido apolar pequeno e não-aromático (Leu) na posição P1 da segunda alça que confere a especificidade de ligação para quimase que, particularmente, é uma enzima tipo-quimotripsina, mas não possui um bolsão apolar capaz de acomodar resíduos com cadeias laterais aromáticas como a própria quimotripsina possui (AHMAD & FERRARIO, 2018).

A capacidade do CETI inibir quimase de maneira específica na faixa nanomolar baixa (IC50 13,8 nM), o torna um candidato interessante para o prosseguimento da caracterização pré-clínica. Além disso, a quimase é um alvo importante, pois é amplamente expressa e estocada em células inflamatórias como mastócitos e também em células do sistema cardiovascular e renal (DELL'ITALIA *et al.*, 2018). Atualmente, a quimase é reconhecida como a principal via de geração de Ang II no ambiente intracelular (FROOGH *et al.*, 2017). Essa via é ativada pelos produtos avançados de glicação e espécies reativas de oxigênio (ROS) que são comumente formados em um ambiente hiperglicêmico como aquele que ocorre no diabetes, por exemplo (LAVRENTYEV *et al.*, 2007). De forma semelhante, a quimase parece ter papel fundamental na gênese e evolução de outras patologias vasculares como aterosclerose e aneurisma, onde o aumento de proliferação e migração de células vasculares e a degradação de matriz extracelular exacerbada são eventos cruciais (SUN *et al.*, 2009).

Os dados aqui obtidos indicam que o CETI é capaz de bloquear a atividade enzimática da quimase *in vitro* e *in vivo*. CETI inibe quimase de rato, quimase humana, quimase proveniente de mastócitos, de células da musculatura lisa vascular de aorta e também bloqueia a geração de Ang II a partir da clivagem de seu substrato natural, a Ang I. À semelhança de outros inibidores da mesma classe, o CETI parece ter uma ação anti-inflamatória promissora, uma vez que reduziu o extravasamento vascular induzido pela degranulação de mastócitos, no entanto outros testes devem ser realizados também em modelos de inflamação aguda e crônica.

Em células vasculares de aorta, o CETI reduziu os efeitos intracelulares mediados por quimase e induzidos pelo cultivo em meio hiperglicêmico. Reduzindo a atividade da quimase houve também diretamente uma inibição da geração de Ang II intracelular nas células vasculares. Majoritariamente, tanto a Ang II gerada no ambiente intracelular, quanto aquela produzida num ambiente pró-inflamatório perivascular, vai atuar diretamente sobre os receptores AT1R, modulando a produção de ROS, a expressão de metaloproteinases de matriz, a proliferação, migração e hipertrofia celular (SANTOS *et al.*, 2000). De fato, a ativação do AT1R pela Ang II estimula a produção de superóxido via NADPH oxidase (Nox) e o ROS derivado da Nox pode ainda disparar vias de sinalização relacionadas à proliferação celular e inflamação, tais como MAPKs, ERK e NF- κ B (MORAES *et al.*, 2012). Na aterosclerose, por exemplo, já foi demonstrado que o ROS derivado da Nox via ativação do AT1R aumenta a fosforilação de ERK-2, um elemento chave que regula a proliferação e migração das células vasculares (HANSSON & LIBBY, 2006). Essas células que migram acabam se acumulando na camada neointima do vaso contribuindo assim para a hipertrofia, formação de trombos,

restenose e, em casos avançados, para a completa obstrução do vaso (LIBBY, 2002). Portanto, o bloqueio deste eixo pode ser crucial para proteção vascular em condições de aterosclerose, aneurisma ou diabetes. De forma interessante, aqui nós mostramos que o CETI reduziu significativamente os níveis intracelulares de superóxido e a geração de ROS total, o que pode estar associado à diminuição dos níveis de Ang II via quimase nas células vasculares tratadas com o inibidor. Ainda, houve redução significativa da proliferação e migração celular. Acreditamos que esta redução de proliferação observada esteja efetivamente associada à regulação negativa do eixo Ang II-AT1R-Nox, já que o CETI não demonstrou nenhum efeito tóxico direto para as células em cultivo.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho isolamos e caracterizamos pela primeira vez o CETI, um inibidor da família Bowman-Birk obtido das sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis* (**Fig. 23**). A molécula possui duas alças reativas, sendo um domínio inibitório específico para ligação com tripsina e um segundo domínio inibitório para ligação específica de quimase. É um inibidor não-competitivo para tripsina e competitivo para quimase. Bloqueia ambas enzimas com valores de K_i e IC_{50} na faixa nanomolar. O CETI é solúvel em solução aquosa, é como trímico em solução e possui ampla estabilidade estrutural às variações de temperatura, pH e agentes redutores. O CETI é capaz de inibir quimase de rato, quimase humana, quimase proveniente de mastócitos, de células da musculatura lisa vascular de aorta e também bloqueia a geração de Ang II. *In vivo* o inibidor demonstrou uma potencial ação anti-inflamatória reduzindo o extravasamento vascular induzido pela degranulação de mastócitos. *In vitro*, atenuou a ativação do eixo Ang II-AT1R-Nox-ROS diminuindo a proliferação e migração de células vasculares de aorta cultivadas em meio hiperglicêmico. Dessa forma, acreditamos que os resultados apresentados demonstram o potencial interessante que tem o CETI de seguir no desenvolvimento pré-clínico principalmente para o tratamento de alterações vasculares onde a geração de Ang II ocorre majoritariamente via quimase. Nesses casos, os clássicos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) não são indicados ou possuem pouco efeito terapêutico e, portanto, abre-se um nicho de atuação farmacológica que vem sendo pouco explorado atualmente.

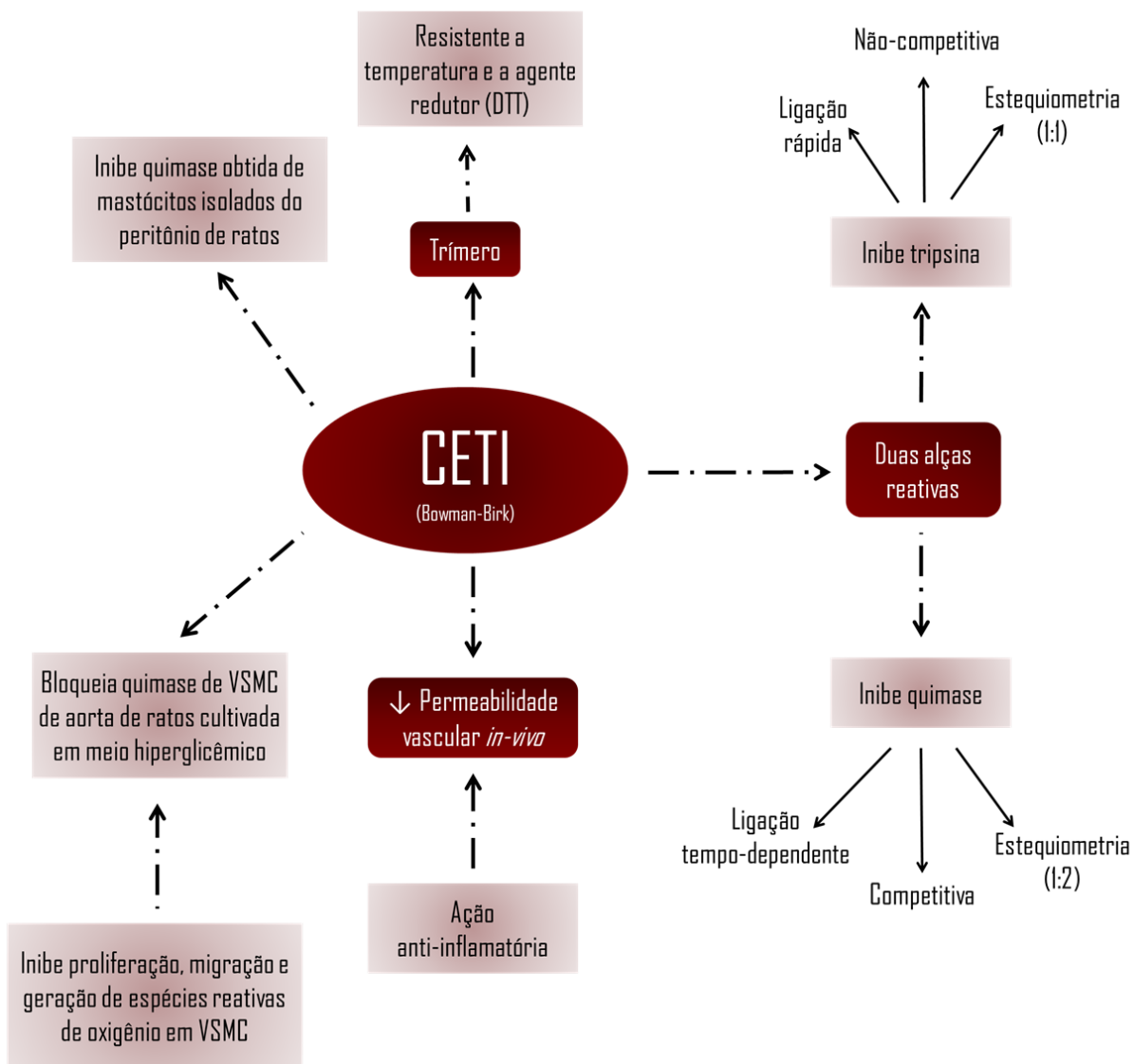


Figura 23. Representação esquemática e principais resultados obtidos.

7. REFERÊNCIAS

AHMAD, S., FERRARIO, C. M. Chymase inhibitors for the treatment of cardiac diseases: a patent review (2010–2018). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 28, n. 11, p. 755-764, 2018;

BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annual review of pharmacology and toxicology**. v. 50, p. 439-465, 2010;

BERGER, M., PINTO, A. F., GUIMARÃES, J. A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 488-501, 2008;

BERGER, M., SANTI, L., BEYS-DA-SILVA, W. O., OLIVEIRA, F. M., CALIARI, M. V., YATES, J. R., VIEIRA, M. A., GUIMARÃES, J. A. Mechanisms of acute kidney injury induced by experimental *Lonomia obliqua* envenomation. **Archives of toxicology**, v. 89, n. 3, p. 459-483, 2015;

BEYS-DA-SILVA, W. O., SANTI, L., BERGER, M., CALZOLARI, D., PASSOS, D. O., GUIMARÃES, J. A., MORESCO, J. J., YATES, J. R. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 5, p. 2282-2296, 2014;

CALVO, E., MIZURINI, D. M., SÁ-NUNES, A., RIBEIRO, J. M., ANDERSEN, J. F., MANS, B. J., MONTEIRO, R. Q., KOTSYFAKIS, M., FRANCISCHETTI, I. M. Alboserpin, a factor Xa inhibitor from the mosquito vector of yellow fever, binds heparin and membrane phospholipids and exhibits antithrombotic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 32, p. 27998-28010, 2011;

CARLINI, C. R., GOMES, C., GUIMARÃES, J. A., MARKUS, R. P., SATO, H., TROLIN, G. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. **Acta pharmacologica et toxicologica**, v. 54, n. 3, p. 161-166, 1984;

CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 667-675, 1981;

CARVALHO, P. C., FISCHER, J. S., CHEN, E. I., YATES, J. R., BARBOSA, V. C. PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 316, 2008;

CHMELAR, J., OLIVEIRA, C. J., REZACOVA, P., FRANCISCHETTI, I. M., KOVAROVA, Z., PEJLER, G., RIBEIRO, J. M. C., MARES, M., KOPECKY, J., KOTSYFAKIS, M. A. tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 736-744, 2011;

CLEMENTE, A., DEL CARMEN ARQUES, M. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 30, p. 10305, 2014;

COSTA, H. P., OLIVEIRA, J. T., SOUSA, D. O., MORAIS, J. K., MORENO, F. B., MONTEIRO-MOREIRA, A. C., VIEGAS, R. A., VASCONCELOS, I. M. JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 5, 2014;

DAHMER, T., BERGER, M., BARLETTE, A. G., RECK, J. JR., SEGALIN, J., VERZA, S., ORTEGA, G. G., GNOATTO, S. C., GUIMARÃES, J. A., VERLI, H., GOSMANN, G. Antithrombotic effect of chikusetsusaponin IVa isolated from *Ilex paraguariensis* (Maté). **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 12, p. 1073-1080, 2012;

DE PAULA, F. T., FRAUCHES, P. Q., PEDEBOS, C., BERGER, M., GNOATTO, S. C., GOSSMANN, G., VERLI, H., GUIMARÃES, J. A., GRAEBIN, C. S. Improving the thrombin inhibitory activity of glycyrrhizin, a triterpenic saponin, through a molecular simplification of the carbohydrate moiety. **Chemical biology & drug design**, v. 82, n. 6, p. 756-760, 2013;

DELL'ITALIA, L. J., COLLAWN, J. F., FERRARIO, C. M. Multifunctional role of chymase in acute and chronic tissue injury and remodeling. **Circulation research**, v. 122, n. 2, p. 319-336, 2018;

DÜNGEN, H. D., KOBER, L., NODARI, S., SCHOU, M., OTTO, C., BECKA, M., KANEFENDT, F., WINKELMANN, B. R., GISLASON, G., RICHARD, F., NIELSEN, O. W., GHEORGHIADU, M., SENNI, M. Safety and tolerability of the chymase inhibitor fulacimstat in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction—results of the CHIARA MIA 1 trial. **Clinical pharmacology in drug development**, v. 8, n. 7, p. 942-951, 2019;

- EGUCHI, S., KAWAI, T., SCALIA, R., RIZZO, V. Understanding angiotensin II type 1 receptor signaling in vascular pathophysiology. **Hypertension**, v. 71, n. 5, p. 804-810, 2018;
- FERRARIO, C. M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease—therapeutic implications of more than a century of research. **Journal of the Renin-angiotensin-aldosterone System**, v. 7, n. 1, p. 3-14, 2006;
- FROOGH, G., PINTO, J. T., LE, Y., KANDHI, S., ALELIGNE, Y., HUANG, A., SUN, D. Chymase-dependent production of angiotensin II: an old enzyme in old hearts. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 312, n. 2, p. H223-H231, 2016;
- GAVRAS, H., LEVER, A. F., BROWN, J. J., MACADAM, R. F., ROBERTSON, J. I. S. Acute renal failure, tubular necrosis, and myocardial infarction induced in the rabbit by intravenous angiotensin II. **The Lancet**, v. 298, n. 7714, p. 19-22, 1971;
- GROSSE-HOLZ, F. M., VAN DER HOORN, R. A. Juggling jobs: roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. **New Phytologist**, v. 210, n. 3, p. 794-807, 2016;
- HANSSON, G. K., LIBBY, Y. P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 508, 2006;
- HEUZÉ, V., TRAN, G. J **Feedipedia**, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO, 2015. Jack bean (*Canavalia ensiformis*). Disponível em < <https://www.feedipedia.org/node/327> > Acesso em : 04 de dez. 2019;
- HOHMANN, M. S., CARDOSO, R. D., PINHO-RIBEIRO, F. A., CRESPIGIO, J., CUNHA, T. M., ALVES-FILHO, J. C., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q., CASAGRANDE, R., VERRI W. A. JR. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. **BioMed research international**, v. 2013, p. 13, 2013;
- INOUE, N., MURAMATSU, M., JIN, D., TAKAI, S., HAYASHI, T., KATAYAMA, H., KITAURA, Y., TAMAI, H., MIYAZAKI, M. Effects of chymase inhibitor on angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm development in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 204 n. 2, p. 359-64, 2009;
- KANEFENDT, F., THUB, U., BECKA, M., BOXNICK, S., BERSE, M., SCHULTZ, A., OTTO, C. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of the novel chymase inhibitor BAY 1142524 in healthy male volunteers. **Clinical pharmacology in drug development**, v. 8, n. 4, p. 467-479, 2019;

KOTSYFAKIS, M., SÁ-NUNES, A., FRANCISCHETTI, I. M., MATHER, T. N., ANDERSEN, J. F., RIBEIRO, J. M. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26298-26307, 2006;

KOVAROVA, M. Isolation and characterization of mast cells in mouse models of allergic diseases. In: **Mouse Models of Allergic Disease**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 109-119, 2013;

LASKOWSKI, M. J. R., KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual review of biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 593–626, 1980;

LAVRENTYEV, E. N., ESTES, A. M., MALIK, K. U. Mechanism of high glucose-induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 101, n. 5, p. 455–464, 2007;

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002;

LONGO, G. M., XIONG, W., GREINER, T. C., ZHAO, Y., FIOTTI, N., BAXTER, B. T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, n. 5, p. 625-632, 2002;

MARCEAU, F., REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: Therapeutic perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 845–852, 2004;

MCBRIDE, J. D., WATSON, E. M., BRAUER, A. B., JAULENT, A. M., LEATHERBARROW, R. J. Peptide mimics of the Bowman–Birk inhibitor reactive site loop. **Peptide Science: Original Research on Biomolecules**, v. 66, n. 2, p. 79-92, 2002;

MEHDAD, A., BRUMANA, G., SOUZA, A. A., BARBOSA, J. A. R. G., VENTURA, M. M., DE FREITAS, S. A bowman–birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. **Cell Death Discovery**, v. 2, p. 15067, 2016;

MORAES, J. A., BARCELLOS-DE-SOUZA, P., RODRIGUES, G., NASCIMENTO-SILVA, V., SILVA, S. V., ASSREUY, J., ARRUDA, M. A., BARJA-FIDALGO, C. Heme modulates smooth muscle cell proliferation and migration via NADPH oxidase: a counter-regulatory role for heme oxygenase system. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 394-400, 2012;

MORAES, J. A., RODRIGUES, G., NASCIMENTO-SILVA, V., RENOVATO-MARTINS, M., BERGER, M., GUIMARÃES, J. A., BARJA-FIDALGO, C. Effects of *Lonomia obliqua* Venom on Vascular Smooth Muscle Cells: Contribution of NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species. **Toxins**, v. 9, n. 11, p. 360, 2017;

MÜLLER, F., MUTCH, N. J., SCHENK, W. A., SMITH, S. A., ESTERL, L., SPRONK, H. M., SCHMIDBAUER, S., GAHL W. A., MORRISSEY, G. J. H., RENNÉ, T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. **Cell**, v. 139, n. 6, p. 1143-1156, 2009;

NEHME, A., CERUTTI, C., DHAOUADI, N., GUSTIN, M. P., COURAND, P. Y., ZIBARA, K., BRICCA, G. Atlas of tissue renin-angiotensin-aldosterone system in human: A transcriptomic meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10035, 2015;

NEHME, A., ZOUEN, F. A., DERIS ZAYERI, Z., ZIBARA, K. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 6, n. 2, p. 14, 2019;

NOSOUDI, N., NAHAR-GOHAD, P., SINHA, A., CHOWDHURY, A., GERARD, P., CARSTEN, C. G., GRAY, B. H., VYAVAHARE, N. R. Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by targeted inhibition of matrix metalloproteinase activity with batimastat-loaded nanoparticles. **Circulation research**, v. 117, n. 11, p. e80-e89, 2015;

OLIVA, M. L. V., SAMPAIO, M. U. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 81, n. 3, p. 615–621, 2009;

PAIVA, P. M. G., OLIVA, M. L. V., FRITZ, H., COELHO, L. C. B. B., SAMPAIO, C. A. M. Purification and primary structure determination of two Bowman–Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 545-552, 2006;

PINTO, J. C. S., REMACLE-VOLON, G., SAMPAIO, C. A., DAMAS, J. Collagenase-induced oedema in the rat paw and the kinin system. **European journal of pharmacology**, v. 274, n. 1-3, p. 101-107, 1995;

PRAKASH, B., SELVARAJ, S., MURTHY, M. R. N., SREERAMA, Y. N., RAO, D. R., GOWDA, L. R. Analysis of the Amino Acid Sequences of Plant Bowman-Birk Inhibitors. **journal of molecular evolution**, v. 42, n. 5, p. 560–569, 1996;

QU, L. J., CHEN, J., LIU, M., PAN, N., OKAMOTO, H., LIN, Z., WANG, J., ZHU, G., ZHAO, X., CHEN, X., GU, H., CHEN, Z. Molecular Cloning and Functional Analysis of a Novel Type of Bowman-Birk Inhibitor Gene Family in Rice. **Plant Physiology**, v. 133, n. 2, p. 560–570, 2003;

SAFAVI, F., ROSTAMI, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Experimental and molecular pathology**, v. 93, n. 3, p. 428-433, 2012;

SAMPAIO, C. A., OLIVA, M. L. V., SAMPAIO, M. U., BATISTA, I. F., BUENO, N. R., TANAKA, A. S., AUERSWALD E. A., FRITZ, H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. **Immunopharmacology**, v. 32, n. 1–3, p. 62–66, 1996;

SANTANA, N. A., FERREIRA, P. A. A., TAROUCO, C. P., SCHARDONG, I. S., ANTONIOLLI, Z. I., NICOLOSO, F. T., JACQUES, R. J. S. Earthworms and mycorrhization increase copper phytoextraction by *Canavalia ensiformis* in sandy soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109383, 2019;

SANTOS, R. A. S. D., FAGUNDES-MOURA, C. R., SILVA, A. C. S. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Rev. bras. hipertens**, v. 7, n. 3, p. 227–236, 2000;

SATO, A. C., ANDRADE, S. A., BRITO, M. V., MIRANDA, A., SAMPAIO, M. U., DE ABREU MAFFEI F. H., OLIVA, M. L. Effects of compounds from *Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* juice on blood coagulation and on proteolytic enzymes. **Protein and peptide letters**, v. 19, n. 5, p. 501-508, 2012;

SIEVERS, L. K., ECKARDT, K. U. Molecular mechanisms of kidney injury and repair in arterial hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2138, 2019;

SINGH, V. P., BAKER, K. M., KUMAR, R. Activation of the intracellular renin-angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: role in extracellular matrix production. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 4, p. H1675-H1684, 2008;

SRIKANTH, S., CHEN, Z. Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 470, 2016;

SUN, J., ZHANG, J., LINDHOLT, J. S., SUKHOVA, G. K., LIU, J., HE, A., ABRINK, M., PEJLER, G., STEVENS, R. L., THOMPSON, R. W., ENNIS, T. L., GURISH, M. F., LIBBY,

P., SHI, G. P. Critical role of mast cell chymase in mouse abdominal aortic aneurysm formation. **Circulation**, v. 120, n. 11, p. 973-982, 2009;

TIRLONI, L., KIM, T. K., BERGER, M., TERMIGNONI, C., DA SILVA VAZ, I. JR., MULENGA, A. Amblyomma americanum serpin 27 (AAS27) is a tick salivary anti-inflammatory protein secreted into the host during feeding. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007660, 2019;

TOUIL, T., CIRIC, B., VENTURA, E., SHINDLER, K. S., GRAN, B., ROSTAMI, A. Bowman-Birk inhibitor suppresses autoimmune inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis. **Journal of the neurological sciences**, v. 271, n. 1-2, p. 191-202, 2008;

UDEDIBIE, A. B. I., CARLINI, C. R. Questions and answers to edibility problem of the Canavalia ensiformis seeds - A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 74, n. 2, p. 95-106, 1998;

WARE, J. H., WAN, X. S., NEWBERNE, P., KENNEDY, A. R. Bowman-Birk inhibitor concentrate reduces colon inflammation in mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. **Digestive diseases and sciences**, v. 44, n. 5, p. 986-990, 1999;

WASHBURN, M. P., WOLTERS, D., YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242, 2001;

YANG, J., PAN, X., ZHAO, C., MOU, S., ACHAL, V., AL-MISNED, F. A., MORTUZA, M. G., GADD, G. M. Bioimmobilization of heavy metals in acidic copper mine tailings soil. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, n. 3-4, p. 261-266, 2016.