



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

SHEYLA VARELA LUCENA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE UM INIBIDOR DE
QUIMOTRIPSINA TIPO KUNITZ DE SEMENTE DE
*Erythrina velutina***

**NATAL/RN
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SHEYLA VARELA LUCENA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE UM INIBIDOR DE
QUIMOTRIPSINA TIPO KUNITZ DE SEMENTE DE *Erythrina*
*velutina***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. Maurício
Pereira de Sales**

**NATAL/RN
2010**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Lucena, Sheyla Varela.

Purificação, caracterização e avaliação da atividade antiproliferativa de um inibidor de quimotripsina tipo kunitz de semente de *Erythrina velutina* / Sheyla Varela Lucena. – Natal, RN, 2010.

77 f. : Il.

Orientador: Maurício Pereira de Sales.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Câncer – Dissertação 2. Citotoxicidade – Dissertação. 3. *Erythrina velutina* – Dissertação. I. Sales, Maurício Pereira de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

SHEYLA VARELA LUCENA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE UM INIBIDOR DE
QUIMOTRIPSINA TIPO KUNITZ DE SEMENTE DE *Erythrina*
*velutina***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Pereira
de Sales**

Aprovada em:

Banca Examinadora

Dedico esta obra

*Aos meus amados pais Sirval e Suerda pelo apoio e incentivo, por abrirem mão
da minha presença, mesmo em momentos tão importantes e necessários.*

A todos os meu demais familiares, por todo o auxílio nessa jornada.

Agradecimentos

*A Deus por seu amor infinito e por todas as graças derramadas na minha vida.
“Tudo posso naquele que me fortalece.” (Filipenses 4:13)*

Ao professor Dr. Maurício Pereira de Sales por quem tenho imenso respeito. Agradeço pela confiança e pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

À professora Dra Adriana Uchôa do Departamento de Biologia Celular e Genética e ao professor Dr Hugo Rocha e Dra Adeliãna Oliveira do departamento de Bioquímica pelas sugestões durante a banca de qualificação deste trabalho.

Dra. Giselle Zenker Justo do Departamento de Bioquímica da UNICAMP pelo auxílio na realização dos experimentos essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Elizeu pela calma e pela disponibilidade sempre que qualquer aluno, não só eu, precisasse.

*Aos companheiros da minha **GRANDE** turma de mestrado: Jailma, Leandro, Lígia, Cleysyan e Katrine sinto saudade da nossa época de disciplinas.*

A minha irmã de coração, Daysoca (Felicía), que adora um café leite... Obrigada pela amizade sincera.

As minhas MÃs Lady e Roberta, vocês foram essenciais nos momentos mais difíceis. Não sei o que seria de mim sem vocês.

A “fada” Rafaela, pelo carinho e por sempre se mostrar tão prestativa.

A minha amiguinha Jailma, por todas as consultorias “powerpontísticas”.

A minha amiga grande Virginia, sempre tão empenhada em me levar para o shopping. Obrigada por cada sorriso e cada lágrima compartilhada.

A amiga mais elegante Patrícia, sempre disposta a ajudar.

Ao Jannison pelos momentos irreverentes e pelo apoio nas horas apropriadas.

A Gigi e família (Augusto e Manu) que me receberam tão bem durante a minha estadia em São Paulo.

*Aos colegas do LQFPB da **Velha guarda**: Adeliãna, Leonardo Pepino, Fabiano, Ludovico, Rodrigo, Fabíola, Fabinho, Cleysyan, Aninha, Norba, Paulinha, Tíci e Raphael.*

***Nova guarda**: Richele, Kaline, os Alexandres, Leal, Ana Paula, Luciana e Felipe.*

A todos aqueles que fazem parte do Departamento de Bioquímica, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro com a manutenção de bolsa concedida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.

*“Por isso, cante, chore, dance, sorria e viva intensamente antes que a
cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”*

Charles Chaplin

RESUMO

Um inibidor de quimotripsina do tipo Kunitz foi purificado de sementes de *Erythrina velutina* por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografias de afinidade Tripsina-Sepharose, Quimotripsina-Sepharose e cromatografia de Fase Reversa C-18 no sistema FPLC/AKTA. O inibidor, denominado de EvCI, apresentou uma massa molecular de 17 kDa, determinada por SDS-PAGE. A análise por eletroforese bidimensional (2D) revelou quatro iso-inibidores (valores de pI: 4,42, 4,63, 4,83 e 5,06). Todos os iso-inibidores apresentaram massa molecular de 17 kDa. A sequência aminoacídica dos peptídeos oriundos da digestão enzimática de EvCI analisada por MALDI-TOF-MS apresentou 100% de identidade com o inibidor de quimotripsina ECI de *Erythrina variegata*. EvCI inibiu competitivamente a atividade de quimotripsina com K_i de 4×10^{-8} M, mas não inibiu tripsina, elastase pancreática, bromelaína ou papaína. Contudo, inibiu elastase de neutrófilos em 35,91 %. A atividade inibitória de EvCI sobre quimotripsina foi estável em uma ampla faixa de pH e temperatura. Na presença de 100 mM de DTT por 120 min, o inibidor perdeu 50% de sua atividade. A citotoxicidade do inibidor foi avaliada nas linhagens de células HeLa, MDA, HepG2, K562 e PC3 após exposição a concentrações variando de 0,0005 a 200 µg/mL, por 72 horas. O EvCI inibiu o crescimento celular de células HeLa com um IC_{50} de 50 µg/mL. Os resultados obtidos na avaliação de indução de morte celular e efeitos sobre o ciclo celular em células HeLa, indicam que o principal efeito do inibidor é a indução de parada do ciclo celular, sendo, portanto, citostático. Os dados sugerem que o EvCI pode ser um composto promissor para ser estudado no futuro como agente citostático na terapia antitumoral combinada.

Palavras Chaves: Câncer, Citotoxicidade, *Erythrina velutina*, HeLa, Kunitz, Quimotripsina.

ABSTRACT

A chymotrypsin inhibitor was purified from *Erythrina velutina* seeds by ammonium sulphate fractionation, affinities chromatographies on Trypsin-Sepharose, Quimotrypsin-Sepharose and reversed phase C-18 FPLC/AKTA system. The inhibitor, named EvCI, shown molecular mass of 17 kDa, as determined by SDS-PAGE. 2D-PAGE showed four isoinhibitors with pI values of 4,42, 4,63, 4,83 and 5,06, with molecular mass of 17 kDa each. The aminoacid sequence of EvCI was determined by MALDI-TOF-MS and showed a high similarity with other Kunitz-type inhibitor of *Erythrina variegata*. EvCI competitively inhibited chymotrypsin, with K_i of 4×10^{-8} M, but did not inhibited trypsin, pancreatic elastase, bromelain and papain. The inhibitory activity of EvCI was stable over wide pH and temperature ranges. In the presence of DTT 100 mM for 120 min, EvCI lost 50 % of activity. Cytotoxicity was studied in HeLa, MDA, HepG2, K562 and PC3 cells after 72h incubation period. EvCI inhibited HeLa cells growth with an IC_{50} value of 50 μ g/ml. Subsequent studies in HeLa cells analysis of cell death by annexin V/PI double-staining and cell cycle, using flow cytometry. The results provide evidence for a cytostatic activity of EvCI and support further studies on potential application of this inhibitors as an antiproliferative agent in combined therapy against cervical cancer.

Key words: Cytotoxicity, Cancer, Chymotripsin, *Erythrina velutina*, HeLa, Kunitz.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo ilustrando a interação entre uma protease, inibidores de protease anticarcinogênicos e c-myc.....	22
Figura 2. Esquema de extração e fracionamento com sulfato de amônio.....	27
Figura 3. Inibição da atividade de tripsina e de quimotripsina pelas frações protéicas de sementes de <i>E. velutina</i>	42
Figura 4. Perfil de eluição de F2 em coluna de afinidade tripsina - sepharose.....	44
Figura 5. Perfil de eluição do material não-retido em tripsina - sepharose de F2 em coluna de afinidade quimotripsina-sepharose.....	45
Figura 6. Cromatografia de fase reversa RPC18 de EvCl.....	46
Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida de EvCl	48
Figura 8. Determinação da massa molecular aparente de EvCl a partir de migração em gel de poliacrilamida - SDS PAGE.....	49
Figura 9. Eletroforese bidimensional de EvCl.....	50
Figura 10. Identificação de EvCl por impressão digital de peptídeos (peptides fingerprint anaysis).....	51
Figura 11. Determinação do IC ₅₀ de EvCl.....	52
Figura 12. Determinação da relação molar entre EvCl e quimotripsina.....	53
Figura 13. Cinética de inibição de EvCl sobre a atividade da quimotripsina.....	54
Figura 14. Determinação do valor de K _i de EvCl.....	54
Figura 15. Estabilidade de EvCl a variação de pH.....	56
Figura 16. Estabilidade de EvCl em diferentes temperatura.....	57
Figura 17. Estabilidade de EvCl ao agente redutor DTT.	58
Figura 18. Efeito de EvCl sobre o ciclo celular de células HeLa.....	59
Figura 19. Avaliação de morte celular de células HeLa após marcação positiva para anexina V-FITC (An+), iodeto de propídeo (PI+).....	60
Figura 20. Populações de células HeLa nas diferentes fases do ciclo celular após 72 h de tratamento com 50 µg/mL de inibidor.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das endopeptidases ou proteinases.....	17
Tabela 2. Família de inibidores de proteinases de plantas.....	18
Tabela 3. Modelo para radiação e efeito do inibidor de protease na expressão de c-myc.....	23
Tabela 4. Etapas de purificação de EvCI.....	47
Tabela 5. Especificidade de EvCI para enzimas serínicas e cisteínicas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AcOH	Ácido acético
ACN	Acetonitrila
BANA	α -N-benzoil-arginina-p-naftilamida
BAPNA	α -N-benzoil-arginina-p-nitroanilina
β-Me	β -Mercaptoetanol
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl₂	Cloreto de cálcio
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno dianimotetracético
EtOH	Álcool etílico ou etanol
HCl	Ácido clorídrico
MeOH	Álcool metílico ou metanol
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
PITC	Fenilisocianato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TCA	Ácido tricloroacético
Temed	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS.....	xi
 1. INTRODUÇÃO.....	 14
1.1. Considerações gerais.....	14
1.2 Câncer Cervical.....	15
1.3 Proteases e seus inibidores protéicos.....	16
1.3.1 Família Bowman-Birk.....	18
1.3.2. Família Kunitz.....	19
1.4 Inibidores de proteases contra o câncer.....	20
 2. OBJETIVOS.....	 24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 25
3.1.Materiais.....	25
3.1.1 Sementes.....	25
3.1.2. Reagentes.....	25
3.1.3. Equipamentos.....	26
3.2 .Métodos.....	26
3.2.1. Preparação dos extratos protéicos de <i>E velutina</i>	26
3.2.1.1 Fracionamento protéico com sulfato de amônio.....	27
3.2.2. Quantificação de proteínas.....	28
3.2.3. Ensaio de inibição.....	28
3.2.3.1 Preparo dos substratos.....	28
3.2.3.2 Atividade anti-quimotríptica.....	28
3.2.3.3 Atividade anti-tríptica	29
3.2.4 Isolamento e Purificação.....	29
3.2.4.1 Cromatografia de Afinidade em coluna de Tripsina acoplada a Sepharose 4B.....	29
3.2.4.2 Cromatografia Afinidade em Quimotripsina- Sepharose.....	30
3.2.4.3 Cromatografia Fase reversa C18 sistema de purificação FPLC/AKTA	30
3.2.5 Caracterização bioquímica.....	31
3.2.5.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínuo e Desnaturante (SDS-PAGE).....	31
3.2.5.2 Determinação do ponto isoeletrico e da presença de isoformas	32
3.2.5.3 Determinação da identidade do inibidor por espectrometria de massas MALDI-TOF-MS.....	33
3.2.5.4 Propriedades inibitórias e determinação da constante de inibição.....	34
3.2.5.4.1 Determinação do IC ₅₀	34
3.2.5.4.2 Determinação da relação molar inibidor-enzima.....	34
3.2.5.4.3 Determinação da constante de inibição e do mecanismo de inibição.....	35
3.2.5.5 Especificidade do inibidor para proteases serínicas e cisteínicas.....	35
3.2.5.5.1 Inibição da tripsina.....	35
3.2.5.5.2 Inibição da papaína.....	36
3.2.5.5.3 Inibição da elastase pancreática.....	36

3.2.5.5.4 Inibição para elastase neutrofílica	36
3.2.5.6 Estabilidade do inibidor em diferentes valores de pH.....	37
3.2.5.7 Estabilidade térmica do inibidor.....	37
3.2.5.8 Estabilidade na presença do agente redutor DTT.....	37
3.2.6 Cultura de células.....	38
3.2.7 Ensaio de viabilidade celular.....	38
3.2.8. Análise por citometria de fluxo.....	38
3.2.8.1. Avaliação de morte celular utilizando-se marcação com anexina V/PI.....	38
3.2.8.2. Avaliação do ciclo celular.....	39
3.2.9. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Isolamento e purificação do inibidor de quimotripsina de sementes de <i>E. velutina</i>	41
4.1.1 Determinação da atividade inibitória sobre as proteases serínicas, tripsina e quimotripsina, nas frações protéicas de <i>E. velutina</i>	41
4.1.2 Cromatografia de afinidade em coluna de Tripsina-Sepharose CL 4B...	42
4.1.3 Cromatografia de afinidade em coluna de Quimotripsina-Sepharose 4B	45
4.1.4 Cromatografia de fase reversa coluna uRPC18 (Sistema de Purificação FPLC/AKTA).....	46
4.2 Purificação do inibidor de quimotripsina de EvCl.....	46
4.3 Caracterização bioquímica.....	47
4.3.1 Eletroforese.....	47
4.3.2 Determinação da massa molecular.....	48
4.3.3 Determinação do ponto isoelétrico (pI) e da identidade e sequência do inibidor.....	49
4.3.4. Determinação do IC ₅₀	52
4.3.5. Determinação da relação molar inibidor-enzima.....	52
4.3.6 Determinação da constante de inibição e do mecanismo de inibição.....	53
4.3.7 Especificidade para proteases serínicas e cisteínicas.....	55
4.3.8 Estabilidade em diferentes valores de pH.....	55
4.3.9 Estabilidade térmica.....	56
4.3.10 Estabilidade na presença de DTT.....	57
4.3.11 Efeitos de EvCl sobre a proliferação celular.....	58
4.3.12 Efeitos do inibidor sobre a indução de apoptose/necrose em células HeLa.....	59
4.3.13 Efeitos do inibidor sobre o ciclo celular em células HeLa.....	60
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A natureza constitui uma fonte abundante de produtos naturais biologicamente ativos com propriedades promissoras (Ferreira *et al.*, 2006). Na sociedade pré-industrializada e em sociedades agrárias, compostos naturais derivados de plantas foram usados por populações indígenas como forma de terapia para uma grande diversidade de patologias. Atualmente, muitos desses compostos, produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, insetos e outros organismos, terrestres e marinhos, já foram isolados, identificados e caracterizados biológica e farmacologicamente. De acordo com (Newman; Cragg, 2007)) mais de 60% dos fármacos com atividade anticâncer foram isolados de fontes naturais ou relacionados a elas. Aproximadamente um quarto de todos os medicamentos fabricados e consumidos hoje possuem substâncias derivadas de plantas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, de 252 medicamentos considerados básicos e essenciais, 11% são exclusivamente extraídos de plantas e outra importante proporção é derivada de precursores naturais extraídos de plantas (Rates, 2001). As plantas têm sido descritas como uma das principais fontes de novas moléculas anticarcinogênicas. Evidências epidemiológicas indicam que o consumo de plantas da família Leguminosae (feijões, ervilhas, soja) está associado a baixas taxas de incidência e mortalidade por câncer, especialmente para os cânceres de mama, cólon e próstata (Kennedy, 1998b).

A importância de compostos extraídos de plantas chamou a atenção dos Estados Unidos da América (National Cancer Institute) que, entre 1960 e 1982, realizaram testes anticarcinogênicos com mais de 35.000 amostras de plantas (Mann, 2002). Apesar do potencial efeito citotóxico desses compostos contra células de câncer, muitos deles ainda apresentam efeitos colaterais severos (Fallowfield *et al.*, 2004; Mortimer *et al.*, 1999). Consequentemente, a busca por novas moléculas anticarcinogênicas extraídas de plantas continua. Plantas consumidas normalmente na dieta dos seres humanos contêm diversas moléculas com potencial anticarcinogênico com chances de normalizar efeitos colaterais (Kennedy, 1998b). Atualmente, há uma intensa busca por moléculas potencialmente efetivas contra o desenvolvimento do câncer e não-indutoras de efeitos colaterais severos. Dentro

desse contexto, moléculas purificadas de sementes de plantas da família Leguminosae, com destaque para os inibidores de protease, têm sido bastante investigadas (Kennedy, 1998b).

Nas plantas superiores, várias famílias de inibidores de proteases, particularmente inibidores de tripsina, têm sido extensivamente estudadas (Laskowski Jr.; M.; Kato, 1980). Do ponto de vista histórico, os inibidores de protease são considerados fatores antinutricionais das sementes de leguminosas e de cereais, devido a sua capacidade de diminuir a digestibilidade das proteínas da dieta (Forster *et al.*, 1999). Porém, essas moléculas têm atraído a atenção de muitos pesquisadores devido às suas atividades biológicas (Magni *et al.*, 2007). Elas apresentam um papel importante na defesa das plantas contra insetos pragas e são conhecidas por estarem envolvidas em algumas funções biológicas e heterólogas tais como coagulação sanguínea, agregação plaquetária e anticarcinogênese (Kennedy, 1998b; Oliva *et al.*, 2000).

1.2 Câncer cervical

O câncer está incluído entre as principais causas de morte mundial. No ano de 2005, de um total de 35 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, representando 21,7% de todas as mortes (Who, 2005). Estima-se que em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões e até 2030 o câncer deverá alcançar a maior taxa de mortalidade comparada a outras doenças, até então consideradas como de maior ocorrência (Jemal *et al.*, 2008).

O câncer de colo do útero apresenta alta incidência em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Nestes, ocupa o primeiro lugar em ocorrência, com grande impacto na mortalidade (Pisani *et al.*, 1999). No Brasil são esperados 18.430 casos de câncer de colo do útero em 2010, com risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. Este tipo de câncer é, na maioria dos casos, associado a fatores extrínsecos, isto é, relacionados ao ambiente e aos hábitos de vida da população. A relação entre câncer do colo uterino e os hábitos sexuais (promiscuidade, grande número de filhos, início precoce da atividade sexual e infecções ginecológicas repetidas) levou à identificação do Papillomavirus humano

(HPV) como um fator causal desta doença (Cavalcanti *et al.*, 1996; Munoz *et al.*, 2003). Diversos fatores do meio ambiente, destacando o estilo de vida, têm importância no favorecimento de condições propícias à prevalência do vírus e os tratamentos mais utilizados atualmente para esta doença são cirurgia, quimioterapia, radioterapia.

1.3 Proteases e seus inibidores proteicos

Proteases são enzimas que degradam proteínas, e são classificadas, de acordo com seu mecanismo de ação e a presença de resíduos específicos de aminoácidos em seus sítios ativos em: serínicas, cisteínicas, aspárticas, metaloproteases (Rawlings; Barrett, 1994) (Tabela 1) e, mais recentemente, treonina-proteases. Essas enzimas se encontram subdivididas em duas grandes classes, as exopeptidases, que participam da degradação de proteínas clivando ligações peptídicas entre aminoácidos da extremidade amino terminal e c-terminal das proteínas e as endopeptidases ou proteinases que degradam de proteínas clivando ligações peptídicas internas (Fan; Wu, 2005; Storey; Wagner, 1986).

Tabela 1 - Classificação das endopeptidases ou proteinases

Famílias	Faixa de pH ótimo	Resíduos do Sítio Ativo	Enzimas	Principais Sítios de Ação
Serínica (E.C. 3.4.21)	7,0 – 9,0	Asparagina Serina Histidina	Tripsina Quimotripsina Elastase	Arginina e Lisina Triptofano, Tirosina, Fenilalanina, Leucina, Metionina, Isoleucina, Serina, Treonina, Valina e Histidina. Alanina, Serina e Glicina.
Cisteínica (E.C. 3.4.22)	4,0 – 7,0	Cisteína Aspartato Histidina	Papaína Catepsinas (B, H, L) Ficina Bromelaína	Ampla especificidade, mas preferencialmente clivam ligações peptídicas de aminoácidos básicos. (Arginina e Lisina).
Aspártica (E.C. 3.4.23)	< 5,0	Aspartato	Pepsina Catepsina D Renina	Alanina, Valina, Triptofano, Fenilalanina, Tirosina, Leucina e Isoleucina. Leucina
Metalo- protease (E.C. 3.4.24)	7,0 – 9,0	Íon metálico	Carboxipeptidase Termolisina	Ligação amino de resíduos alifáticos Leucina e Fenilalanina

E.C., código dado às enzimas pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular 3, representa a classe = hidrolase; 4, sub-classe = enzimas que hidrolisam ligações peptídicas; 21, sub sub-classe das proteases serínicas; 22, proteases cisteínicas, 23, proteases aspárticas; 24, metalo-proteases.

Fontes: (Storey; Wagner, 1986); NC-IUMBM, 1992;

Inibidores de proteases (IPs) são moléculas, como por exemplo, proteínas e peptídeos, que diminuem ou cessam a atividade de enzimas proteolíticas (Bode; Huber, 1992; Haq; Atif; Khan, 2005). Esses inibidores já foram descritos em todos os reinos (Ishihara *et al.*, 2006; Katunuma *et al.*, 2003; Sano *et al.*, 2005). Em plantas eles foram detectados, isolados e purificados de diferentes tecidos e órgãos vegetais, como em polpa de frutas (Araújo *et al.*, 2004), raízes, caules, folhas, frutos e sã, particularmente abundantes em tubérculos e sementes (Brzin; Kidric, 1995; Ussuf; Laxmi; Mitra, 2001). Os inibidores de proteases vegetais atuam como proteínas de reserva, como reguladores de enzimas endógenas, e estão envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas e/ou patógenos (Park *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 1999; Valueva *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1997; Xavier-Filho, 1993). Eles constituem um grande e complexo grupo que têm em comum a habilidade de formar complexos com proteases, inativando-as (Fan; Wu,

2005). Esses inibidores são capazes de inibir proteases das quatro classes (cisteínicas, serínicas, aspárticas e metaloproteases), sendo denominados inibidores de proteases cisteínicas, serínicas, aspárticas e de metaloproteases (Ryan, 1990) respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Família de inibidores de proteases de plantas

Proteases	Classes de inibidores	Famílias de inibidores
Proteases Serínicas	Inibidores de proteases serínicas	Bowman-Birk, Kunitz, Batata I, Batata II, Superfamília de Cereais, Taumatina, Ragi I-2/milho
Proteases cisteínicas	Inibidores de proteases cisteínicas	Cistatinas de planta (Fitocistatinas)
Proteases Aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas
Metaloproteases	Inibidores de metaloproteases	Inibidores de carboxipeptidases A e B

Os IPs também são subdivididos de acordo com a similaridade da sequência primária, a massa molecular, o número e a posição de pontes dissulfeto, a posição do sítio reativo e a especificidade inibitória (Habib; Fazili, 2007; Koiwa *et al.*, 1997; Laskowski Jr.; M.; Kato, 1980; Neurath, 1996). A classe dos inibidores de protease serínicas é composta por sete famílias: Bowman-Birk, Kunitz, Batata I, Batata II, Superfamília de cereais, Taumatina e Ragi I-2 milho. E entre essas famílias, os inibidores da família Bowman-Birk e Kunitz são os mais investigados (Baudys *et al.*, 1991; Kelloff *et al.*, 2000; Koiwa, *et al.*, 1997; Lawrence; Koundal, 2002; Ritonja *et al.*, 1990; Ussuf; Laxmi; Mitra, 2001). Normalmente os inibidores protéicos são moléculas de baixa massa molecular, variando entre 6 e 50 kDa, sendo que a maioria tem entre 8 e 25 kDa podem ser formados por uma ou mais cadeias polipeptídicas e possuem grande estabilidade sob condições desnaturantes físicas e químicas (Richardson, 1991)

1.3.1 Família Bowman-Birk

A família Bowman-Birk é a segunda classe de inibidores de proteases serínicas mais estudada e é comumente encontrada em sementes de leguminosas. Foi inicialmente isolada da soja e posteriormente encontrada em outras plantas, como

arroz, batata e feijão. Em geral, esses inibidores são moléculas de baixo peso molecular entre, 8 e 10 kDa, de cadeia única, com dois sítios reativos e apresentam um padrão característico de 14 resíduos de cisteína, todos formando pontes dissulfeto intracadeia (Chaudhary *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 1996; Richardson, 1991; Scarafoni *et al.*, 2008). Esse arranjo conservado de sete pontes dissulfeto desempenha um papel importante na estabilização da estrutura tridimensional da molécula (Qi; Song; Chi, 2005; Scarafoni, *et al.*, 2008).

Nas monocotiledôneas, os inibidores Bowman-Birk podem ser divididos em duas classes, em uma delas os inibidores possuem aproximadamente 8 kDa, 5 pontes dissulfeto e apenas um sítio reativo. Na outra classe, as moléculas são de aproximadamente 16 kDa com 10 pontes dissulfeto e dois sítios ativos. Nas dicotiledôneas, os inibidores Bowman-Birk têm aproximadamente 8 kDa, 14 pontes dissulfeto e dois sítios ativos (Qi; Song; Chi, 2005).

Um dos membros mais estudados dessa família é o Bowman-Birk Inhibitor (BBI), também denominado de “BBI clássico” (Qi; Song; Chi, 2005). O BBI é um inibidor purificado de sementes de soja (*Glycine max*), com baixa massa molecular (aproximadamente 8 kDa) e alta estabilidade em diferentes condições de temperatura e pH. Esse inibidor é formado por uma cadeia de 71 resíduos de aminoácidos com sete pontes dissulfeto (Birk, 1985).

Os inibidores Bowman-Birk inibem simultaneamente tripsina e quimotripsina (Birk, 1985). Recentes estudos têm demonstrado que esses inibidores podem desempenhar importantes papéis na cura e/ou prevenção de diversas doenças (Scarafoni, *et al.*, 2008), sendo utilizados como ferramenta alternativa no tratamento de patologias humanas tais como hemorragias, inflamação e câncer (Chen *et al.*, 2005; Fook *et al.*, 2005; Oliva, *et al.*, 2000).

1.3.2 Família Kunitz

Os inibidores do tipo Kunitz são amplamente distribuídos em plantas e foram descritos em leguminosas, cereais e tubérculos (Xavier, 1998), e também detectados em plantas das famílias Solanaceae, Gramineae, Araceae e Alismataceae (Richardson, 1991; Ryan, 1990). Além disso, eles foram encontrados em outros órgãos, tecidos e exsudados das plantas, como látex do mamão (Azarkan *et al.*, 2006; Odani *et al.*, 1996), rizomas tuberosos de várias aráceas (Oliveira, 2001;

Sumathi; Pattabiraman, 1979) e tubérculos de solanáceas (Valueva, *et al.*, 1998; Valueva; Revina; Mosolov, 1997).

Os inibidores Kunitz são caracterizados por serem proteínas com massa molecular entre 18 e 26 kDa, com aproximadamente 180 resíduos de aminoácidos e baixo conteúdo de cisteína, sendo normalmente quatro resíduos formando duas pontes dissulfeto intracadeias. A maioria dos inibidores do tipo Kunitz apresenta um único sítio reativo, por isso são denominados “single-head” (Richardson, 1991) e podem ser constituídos por uma ou duas cadeias polipeptídicas. Em relação à especificidade, os membros da família Kunitz possuem maior atividade inibitória contra as proteases serínicas, principalmente tripsina e quimotripsina. No entanto, eles também inibem outras proteases, incluindo a protease aspártica Catepsina D e a protease cisteínica Papaína (Habib; Fazili, 2007; Oliveira, 2001).

1.4 Inibidores de proteases contra o câncer

O uso de produtos naturais como agentes quimioterápicos tem uma longa história, que teve início com a medicina popular e que através dos anos tem sido incorporada na medicina tradicional e alopática. Varias drogas usadas atualmente no tratamento contra o câncer foram isoladas de espécies de plantas ou de seus derivados (Costa-Lotufo *et al.*, 2005).

Sementes de plantas leguminosas produzem uma grande variedade de proteínas biologicamente ativas, incluindo lectinas (Wong; Ng, 2005), proteínas antifúngicas (Wong; Ng, 2005), inibidores de alfa amilase (Le Berre-Anton, 1997), arcelinas (Paes *et al.*, 2000), proteínas inativadoras de ribossomos (Lam, 1998) e inibidores de proteases (Rao *et al.*, 1999; Ye; Ng; Rao, 2001). A maioria dessas proteínas tem a função de defesa em plantas, por exemplo, proteção contra microrganismos patogênicos e insetos predadores.

Inibidores de proteases são considerados uma classe de proteínas altamente promissoras como agentes quimioterápicos. Existem evidências de que esses inibidores suprimem vários estágios da carcinogênese, incluindo iniciação, promoção e progressão. Embora vários tipos de inibidores de protease apresentem a capacidade de prevenir processos carcinogênicos, os mais potentes são aqueles com a capacidade de inibir quimotripsina (Kennedy, 1998a; Zhang *et al.*, 1999)

A incidência de câncer e a taxa de mortalidade variam muito, e fatores dietéticos têm uma importante função nessa variação (Kelloff, *et al.*, 2000). Diferentes estudos epidemiológicos sugerem que alimentos de origem vegetal, particularmente as leguminosas (Correa, 1981), têm um papel benéfico, diminuindo a incidência de diferentes tipos de câncer. Existem vários inibidores de protease que fazem parte da dieta humana e que têm a capacidade de inibir enzimas do tipo quimotripsina. Um potente inibidor de quimotripsina de soja conhecido como (SBBI) tem sido extensivamente estudado devido à capacidade de prevenir carcinogênese tanto *in vitro* como *in vivo* (Kennedy, 1998b). SBBI tem sido testado tanto purificado como na forma de extrato enriquecido com SBBI chamado de concentrados (CBBI).

Embora muitos estudos tenham sido realizados para determinar os mecanismos que explicariam os efeitos anticarcinogênico dos inibidores de protease os mecanismos precisos pelo quais os inibidores de protease suprimem a carcinogênese são desconhecidos. Várias hipóteses, sobre a atividade anticarcinogênica dos inibidores de protease, são discutidas (Kennedy Ar. New York: Plenum Press, 1993) e diferentes mecanismos foram propostos. Um dos mecanismos que poderia explicar a atividade anticarcinogênica do SBBI é sua toxicidade seletiva para células premalignas e certas células malignas (Kennedy, 1998b). Muitas teorias para explicar os mecanismos de ação anticarcinogênica dos inibidores de proteases estão relacionadas ao fato de esses agentes prevenirem o aumento de radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio em leucócitos polimorfinucleares que funcionam como agentes protumorais. O excesso de radicais livres é uma das causas de câncer, sobretudo, na promoção e início do desenvolvimento do tumor. Alimentos antioxidantes são aqueles ricos em substâncias que podem eliminar os radicais livres evitando danos à membrana celular, proteínas e o DNA da célula. Os IPs funcionam como antioxidantes prevenindo a produção de radicais livres nas células e, conseqüentemente, diminuindo o dano oxidativo (Frenkel *et al.*, 1987).

As proteases apresentam papel central na regulação da expressão gênica. Vários trabalhos têm indicado que inibidores de protease naturais interrompem o processo de transformação maligna revertendo a expressão dos proto-oncogenes c-myc e c-fos (Dittmann; Mayer; Rodemann, 2003). Estudos mostraram que os inibidores reduzem o nível de expressão de c-myc em células tratadas com carcinógenos (Kennedy, 1993), além de normalizar níveis de c-myc elevado por

carcinógenos. Acredita-se que os IPs afetam um ou mais pontos de checagem central envolvidos no processo de transformação maligna (Kennedy, 1998a). Um modelo proposto para explicar como os IPs podem afetar a expressão de c-myc está demonstrado na (Figura 2). Nesse postulado assume-se que radiação e carcinógenos químicos induzem a atividade proteolítica envolvida na regulação do c-myc (Billings *et al.*, 1987; Messadi *et al.*, 1986). Neste caso, as proteases são capazes de destruir a proteína regulatória envolvida na regulação de c-myc que se ligaria a região promotora do gene. A hipótese é que tratamentos com carcinógenos aumentariam os níveis de proteases, que levaria à diminuição da proteína regulatória, culminando com o aumento de c-myc. Os IPs anticarcinogênicos atuariam inibindo as proteases que destroem a proteína regulatória, reduzindo os níveis elevados de c-myc, induzido pelos carcinógenos *in vivo* (Messadi, *et al.*, 1986) e *in vitro* (Billings, *et al.*, 1987) (Tabela 3). Outra hipótese mostrou que os BBIs afetam diretamente fatores de crescimento necessários para o crescimento de células malignas e este efeito está correlacionado com a inibição do crescimento de células cancerosas de pulmão em humanos (Clark *et al.*, 1993).

Ainda há muito a ser explorado no estudo de IPs como agentes anticarcinogênicos. Considerando-se o potencial de aplicação desses inibidores no tratamento de câncer, mais estudos precisam ser realizados, visando à identificação e avaliação de outros representantes de IPs isolados de outras sementes que possam atuar como agentes anticarcinogênicos terapêuticos.

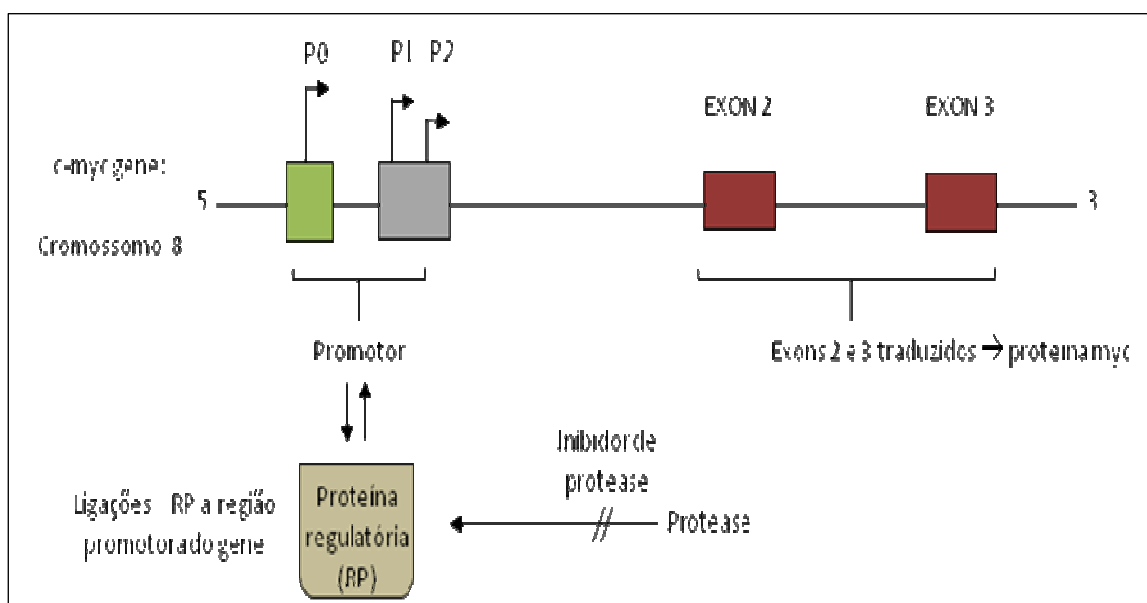


Figura 1. Modelo proposto para explicar como os IPs podem afetar a expressão de c-myc.

Tabela 3 - Modelo para radiação e efeito do inibidor de protease na expressão de c-myc

	Níveis de protease	Proteína regulatória (RP)	Níveis de expressão de c-myc
Regulação normal do gene c-myc	↓ ↑	RP-ativada ligação ao promotor RP-desativada não ocorre ligação ao promotor	↓ ↑
Radiação	↑↑ ²	RP destruído pela protease, RP não ligado ao promotor	↑ ¹
Radiação e Inibidores de protease anticarcinogênico	↓ ³	RP sendo destruído pelo aumento nos níveis de protease; só RP pode se ligar ao promotor	↓

Modelo ilustrando a interação entre uma protease, inibidores de protease anticarcinogênicos e c-myc. Evidência de apoio ao modelo proposto: 1, c-Myc aumenta a expressão da radiação induzida por tumores *in vivo* (Sawey *et al.*, 1987); 2 e 3, aumento dos níveis de protease em tecido cancerígeno tratados *in vivo* (Messadi *et al.*, 1986); protease anticarcinogênica e inibidores da protease retornando aos níveis normais (Messadi *et al.*, 1986).

A purificação e caracterização de um inibidor de quimotripsina presente em sementes de *Erythrina velutina* é um potencial candidato a ser avaliado como agente anticarcinogênico terapêutico. Tornando-se mais uma molécula bioativa de origem natural que pode ser testada e utilizada posteriormente no combate de diversos tipos de câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar e caracterizar um inibidor protéico de quimotripsina presente nas sementes de *Erythrina velutina* (EvCI) e avaliar o seu efeito citotóxico em linhagens de células tumorais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de atividade inibitória das enzimas tripsina e quimotripsina nas frações protéicas da semente de *E. velutina*.
- Purificar o inibidor de quimotripsina presente na semente de *E. velutina*.
- Caracterizar o inibidor quanto a:
 - Massa molecular
 - Cinética da inibição
 - Ponto isoelétrico e presença de isoformas
 - Estabilidade a agentes desnaturantes físicos e químicos.
 - Determinar a especificidade do inibidor quanto a:
 - Proteases serínicas e cisteínicas
- Avaliar a citotoxicidade do EvCI em linhagens de células tumorais, empregando o ensaio de redução do sal de tetrazolio para análise da viabilidade celular.
- Avaliar a indução de morte celular e os efeitos sobre o ciclo celular, empregando-se marcação com anexina V/PI e análise por citometria de fluxo

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Sementes

As sementes de *Erythrina velutina* foram gentilmente fornecidas pela Divisão Técnica do Setor de Sementeiras do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), Natal-RN.

3.1.2 Reagentes

- Proteases serínicas: Tripsina, quimotripsina, elastase de pâncreas bovino, elastase neutrofílica – neutrófilo humano.
- Protease cisteínica: Papaína – látex de mamão
- BApNA: Benzoilarginina nitroanilida
- BANA: Benzoilarginina beta-naftilamida
- SAAvNA: N-succinil-ala-ala-val-p-nitroanilida
- Azocaseína
- BSA (albumina sérica bovina)
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- DTT (ditiotreitól)
- EDTA (ácido etileno diaminotetracético)
- Sepharose-4B
- SDS (dodecil sulfato de sódio)
- TEMED – N, N, N-tetrametiletilinodiamino

Esses reagentes foram obtidos de Sigma Aldrich

- Padrão de massa molecular (Fermentas life sciences):
- TCA (ácido tricloroacético) - VETEC Química Fina LTDA

Todos os outros reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico, sendo manuseados segundo recomendação do fabricante, quando especificado.

3.1.3 Equipamentos

- Agitador Magnético Tecnal TE-081
- Espectrofotômetro Femto 700 plus
- Banho – Maria Tecnal – Te 056
- Balança analítica eletrônica Tecnal classe II
- Centrífuga HITACHI CR 21
- Coletor de frações Radifrac da Pharmacia Biotech
- Concentrador 5301 Eppendorff
- FPLC/AKTA Purifier – GE Helthcare Bio-Sciences Corp.
- Microcentrífuga Eppendorf 5410
- Phmetro PHTEK
- Sistema de Eletroforese Unidimensional
- 4700 Proteomic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA).
- Citômetro de fluxo FACSCalibur
- Fluxo laminar horizontal, da Veco (Campinas ,SP,Brasil)
- Incubadora de temperatura controlada e atmosfera de CO₂, modelo 315, acopladas a torpedos de CO₂, por Gas Guards modelo 3030, da forma Scientific (Marietta, OH EUA)
- Leitor de Elisa Victor ² (1420 multilabel counter) da Wallac (Turku, Suécia)

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação dos extratos protéicos de *E. velutina*

As sementes foram descascadas e os cotilédones triturados em um processador até a obtenção de uma farinha de granulação fina. Em seguida, a farinha foi homogeneizada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, na proporção 1:10 (p/v), sob agitação constante por 3 horas a temperatura ambiente. O homogenato foi centrifugado a 8.000 x *g* por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi denominado extrato bruto (Figura 2).

3.2.1.1 Fracionamento proteico com sulfato de amônio

O extrato bruto foi fracionado com sulfato de amônio em três etapas de saturação: 0 – 30%, 30 – 60%, 60 – 90%. Após cada etapa de saturação, a suspensão permaneceu a 4 °C por aproximadamente 20 horas e posteriormente foi centrifugada a 8.000 x *g* por 30 minutos a 4 °C. Os precipitados resultantes de cada fracionamento foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e submetidos à diálise por aproximadamente 20 horas contra o mesmo tampão. Após a diálise as frações foram denominadas de acordo com o grau de saturação (F 1, F2 e F3) e congeladas para utilização posterior (Figura 2).

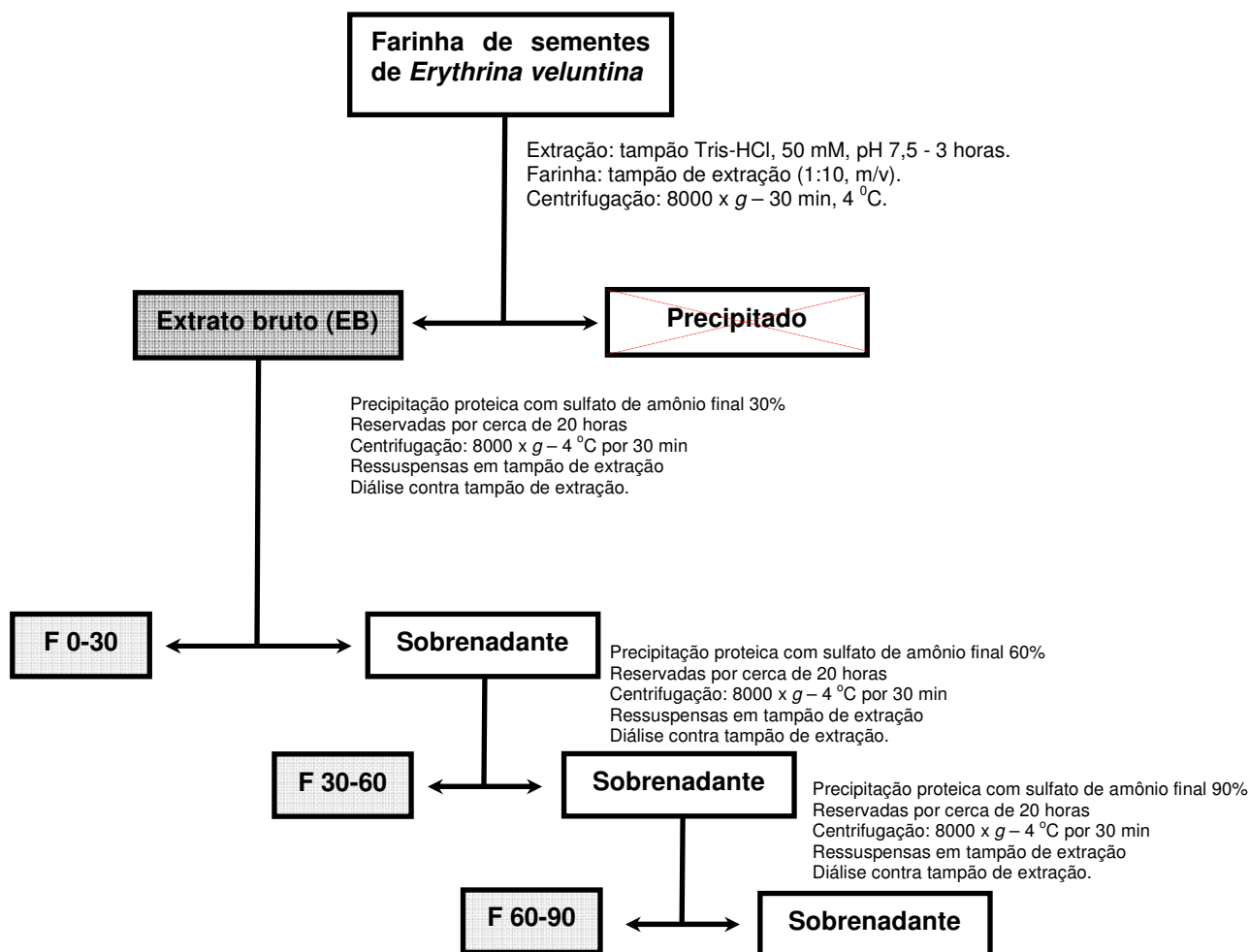


Figura 2. Esquema de extração e fracionamento com sulfato de amônio.

3.2.2 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de (Bradford, 1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

3.2.3 Ensaio de inibição

3.2.3.1 Preparo dos substratos

Azocaseína a 1% (substrato protéico) foi solubilizada em 100 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. A solução foi fervida por cerca de 15 minutos. Após resfriamento o volume foi completado com água destilada. A solução foi conservada a -20 °C até sua utilização.

BApNA (substrato sintético) a 1,25 mM foi dissolvido em 1 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) e o volume completado para 100 mL com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

BANA (substrato sintético) a 1 mM foi dissolvido em 1 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) e o volume completado para 100 mL com tampão fosfato 250 mM, pH 6,0.

SAAvNA foi dissolvido em N,N'-Xdimetilformamida 100% para uma concentração final de 300 mM.

3.2.3.2 Atividade anti-quimotríptica

A atividade inibitória sobre a quimotripsina foi determinada utilizando 20 µL de solução de quimotripsina bovina (0,1 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl₂ 20 mM) pré-incubada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl₂ 20 mM e 100 µL do inibidor por 15 minutos a 37 °C. Após esse período, a reação foi iniciada adicionando-se 200 µL de azocaseína 1%. Decorridos 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 300 µL de solução de TCA 20%. A mistura de reação foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2N na proporção de 1:1. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 440 nm. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

3.2.3.3 Atividade anti-tríptica

A atividade anti-tríptica foi determinada utilizando BApNA como substrato (Erlanger; Kokowsky; Cohen, 1961). Alíquotas de 10 μL de solução de tripsina bovina (0,3 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) foram pré-incubadas por 10 minutos a 37 °C, com 120 μL de HCl 2,5 mM, 270 μL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e 100 μL do inibidor. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 500 μL de BapNA. A reação prosseguiu por mais 15 minutos nas mesmas condições de incubação, sendo interrompida adicionando-se 120 μL de ácido acético 30%. A quantidade de *p*-nitroanilina foi determinada em espectrofotômetro a 410 nm. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

3.2.4 Isolamento e Purificação

3.2.4.1 Cromatografia de Afinidade em coluna de Tripsina acoplada a Sepharose 4B

A cromatografia de afinidade de Tripsina-Sepharose foi realizada utilizando uma coluna montada da seguinte forma: a tripsina bovina foi acoplada a uma resina de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio, seguindo manual do fabricante. Para seu preparo, pesou-se 1 g da Sepharose para cada 3,5 mL final de gel. O pó foi ressuspenso em 50 mL de HCl 1mM, lavado por 15 min, filtrado várias vezes com auxílio de bomba a vácuo e retirado do filtro, adicionando-se 15 mL de HCl 1mM. A tripsina para a ligação foi preparada dissolvendo-se 10 mg de enzima por mL de gel, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, contendo NaCl 500 mM. A solução de tripsina foi então adicionada ao gel e incubou-se por 16 h a 4 °C. Decorrido o tempo, lavou-se o excesso de ligante (tripsina) com 5 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, contendo NaCl 500 mM. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, por duas horas para bloquear quaisquer grupos ativos remanescentes na resina. Decorrido esse tempo, o gel foi lavado com 5 volumes de tampão acetato de sódio 100 mM contendo NaCl 500 mM, pH 4,0, seguido por 5 volumes de Tris-HCl 100 mM

contendo NaCl 500 mM, pH 8,0. Após este procedimento, o gel foi transferido para uma coluna (10 cm x 1,5 cm) e equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

Para a remoção do inibidor de tripsina presente na fração 30-60% de *Erythrina velutina*, essa fração foi aplicada na coluna de afinidade de Tripsina-Sepharose 4B. A concentração de proteína que não saturava a coluna foi determinada pela aplicação de três concentrações de proteínas distintas: 7 mg, 21 mg e 35 mg de proteína da fração 30-60%. O material não-retido na coluna foi eluído com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Já as proteínas retidas na matriz, por sua vez, foram eluídas com HCl 5 mM. O perfil proteico foi acompanhado por espectrofotometria com leitura a 280 nm.

3.2.4.2 Cromatografia de Afinidade em Quimotripsina-Sepharose

Para a cromatografia de afinidade em Quimotripsina-Sepharose foi montada uma coluna acoplando-se quimotripsina bovina à resina Sepharose 4B ativada com brometo cianogênico seguindo manual do fabricante. Para montar a coluna foi utilizado o procedimento descrito anteriormente para a coluna de Tripsina-Sepharose (item 3.2.4.1).

O material não-retido na coluna de Quimotripsina-Sepharose foi eluído com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas com HCl 5mM em seguida dialisadas contra água destilada e liofilizadas. O perfil proteico foi acompanhado por espectrofotometria com leitura a 280 nm.

O pico proteico retido foi submetido a ensaio de inibição de tripsina e de quimotripsina utilizando BApNA e Azocaseína 1% como substratos respectivamente. Em seguida, todo o material foi dialisado e congelado para posterior utilização.

3.2.4.3 Cromatografia de Fase reversa C18 em sistema de purificação FPLC/AKTA

Para a purificação do inibidor, as proteínas adsorvidas na cromatografia quimotripsina-Sepharose foram submetidas à cromatografia de fase reversa C18 em sistema FPLC/AKTA. A coluna foi previamente equilibrada com TFA 0,1% em água. A fase líquida era formada por dois solventes aquosos, denominados solução A (ácido trifluoroacético 0,1% [TFA 0,1%]) e solução B (80% de acetonitrila [ACN 80%])

em TFA 0,1%). As proteínas foram eluídas em três passos : o primeiro passo com 50% de B, no segundo com um gradiente linear de 50-70% e o último passo com 100% de B.

3.2.5 Caracterização bioquímica

3.2.5.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínuo e Desnaturante (SDS-PAGE)

Com o intuito de avaliar o grau de pureza das amostras proteicas, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por (Laemmli, 1970). O gel de separação foi preparado com 1,25 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 1,25 mL de tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; 2,425 mL água destilada; 50 µL de SDS 10%; 5 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio 30%. O gel de concentração continha 0,33 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 625 µL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 1,5 mL de água destilada; 25 µL de SDS 10%; 5 µL de TEMED e 12,5 µL de persulfato de amônio. O tampão de corrida consistia de Tris 25 mM; glicina 192 mM e SDS 10%. Uma vez diluída em tampão de amostra Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol, num volume de 20 µL, a alíquota foi aplicada no gel (10 x 14 cm, com espaçadores de 0,75 mm), o qual foi submetido a uma corrente constante de 20 mA por, aproximadamente 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado segundo procedimento descrito por Weber e Osborne (1969). A solução corante foi preparada usando-se Comassie Blue R-250 a 1%, metanol 40% e ácido acético 10% em água destilada. O descoloramento foi feito com uma solução contendo ácido acético 10% e etanol 30%. Para determinar a massa molecular da proteína isolada, foram utilizados padrões de proteínas com massas moleculares conhecidas.

3.2.5.2 Determinação do ponto isoeletrico e da presença de isoformas

Para a determinação do ponto isoeletrico (pI) e presença de isoformas em EvCI foi realizada uma eletroforese bidimensional (O'farrell, 1975). A primeira dimensão, focalização isoeletrica (IEF) das proteínas, foi realizada em uma tira de 7 cm com gradiente imobilizado de pH 3 – 10 linear em gel de poliacrilamida fixado em plástico (GE Healthcare). Cerca de 10 µg de EvCI foram misturados com 125 µL de solução de reidratação (8 M uréia, 0,5% CHAPS, 0,2% de tampão IPG, 15 mM DTT e traços de azul de bromofenol) (Gorg *et al.*, 1998). A tira foi reidratada diretamente com a amostra em sarcóforo por 16 horas. Após a reidratação, a focalização ocorreu em três etapas de 500Vhr, 1000Vhr e 8000Vhr, totalizando 15500Vhr. Após a IEF a tira foi imediatamente equilibrada em solução contendo 6 M uréia, 30% (p/v) glicerol e 2% (p/v) SDS em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,8 e 50 µL de solução de azul de bromofenol 0,25% (p/v) em duas etapas de 15 minutos cada. Na primeira foram adicionados 50 mg de DTT à solução de equilíbrio e ao segundo passo foram adicionados 125 mg de iodoacetamida à mesma solução. Após os dois passos de equilíbrio, a tira foi lavada com água destilada, submersas por alguns minutos em tampão de corrida (Laemmli, 1970) e imediatamente submetida à segunda dimensão. A eletroforese (segunda dimensão) das proteínas presentes na tira ocorreu em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por (Laemmli, 1970) na concentração de 12,5 % de poliacrilamida. A corrida foi realizada em dois passos, o primeiro passo ocorreu a 10 mA/gel por 15 minutos, em seguida o segundo passo foi a uma corrente de 30 mA/gel, até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel.

Após a corrida eletroforética, o gel bidimensional foi visualizado por meio de coloração com *Coomassie Blue*. O gel foi fixado e corado por 12 horas em solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% em metanol 40% e ácido acético a 10 %, e foi descorado em solução de 40 % etanol e 10% ácido acético. A imagem do gel bidimensional foi digitalizada utilizando o scanner Labscan. A análise do gel bidimensional para a determinação das massas e pIs dos pontos proteicos foi realizada no programa ImageMaster 2D Platinum, versão 6.0, adquirido da GE Healthcare. A detecção de pontos proteicos foi feita automaticamente seguida de correções manuais.

3.2.5.3 Determinação da identidade do inibidor por espectrometria de massas MALDI-TOF-MS

As amostras para análise por meio de MALDI-TOF-MS (Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser- Espectrômetro de Massa por Tempo-de-Vôo) foram preparadas conforme o protocolo, modificado de (Friedman; Hoving; Westermeier, 2009). A excisão de proteínas para posterior análise por espectrometria de massa foi feita com auxílio de ponteiros de 100 µL novas e estéreis, com a ponta cortada. As proteínas foram retiradas e armazenadas em tubos de 500 µL. Para remoção dos corantes os pedaços de gel contendo as proteínas foram lavados em 200 µL de solução 25 mM de bicarbonato de amônio em acetonitrila 50%. A suspensão foi agitada em agitador de tubos do tipo vortex, e deixada em repouso durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido até total descoloração do gel. Os géis foram desidratados por três lavagens com 25 µL de acetonitrila 100% e em seguida os géis foram secos em sistema de centrifugação a vácuo durante 25 minutos. Na etapa de digestão enzimática os géis foram rehidratados com solução contendo tripsina (10 µg/mL) em 40 mM de tampão bicarbonato de amônio, pH 8,0. A solução com enzima foi aplicada a frio (4°C), as amostras permaneceram em banho de gelo durante 45 minutos e em seguida foram colocadas em estufa a 37°C durante 16 horas. Após este período, os peptídeos, produtos da digestão com tripsina, foram extraídos pela adição de 20 µL de solução bicarbonato de amônio 50 mM aos pedaços de géis, seguidos de ultrassom durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 µL de TFA 0,1% às amostras e estas foram colocadas em banho de ultrassom por 10 minutos. A solução sobrenadante foi coletada e o procedimento de adição de TFA 0,1% e banho de ultrassom foram repetidos 2 vezes, sendo que em cada passo foi feita a coleta da solução sobrenadante. Os peptídeos presentes no sobrenadante foram adsorvidos em ZipTip C18, para concentrá-los e remover contaminantes. Os peptídeos foram eluídos com acetonitrila 50 % em TFA 0,1%. Após a eluição, a solução foi evaporada em sistema a vácuo. Os peptídeos derivados da digestão trípica e eluição dos Ziptips foram enviados para o Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ), Laboratório de Toxicologia, onde, 0,3 µL de amostra foram co-cristalizados com 0,3 µL de matriz (10 mg/mL de ácido α-ciano-4-hidroxicinamínico em solução de TFA 0,1 % com ACN 50%) diretamente na placa do MALDI para as análises espectrométricas. Para a identificação das proteínas foi utilizado o 4700

Proteomic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os dados de MS foram adquiridos modo positivo e reflexivo usando laser de neodímio (Nd^{3+}) inserido em granadas cristalinas de ítrio e alumínio (ND-YAG). Os valores das massas trípticas, obtidas pelas análises espectrométricas em MALDI-TOF e os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) calculados pelo programa ImageMaster Platinum, foram utilizados no sítio MASCOT (disponível em: <<http://www.matrixscience.com/cgi>>) e na base de dados NCBItr, para determinação da identidade das proteínas.

3.2.5.4 Propriedades inibitórias e determinação da constante de inibição

3.2.5.4.1 Determinação do IC_{50}

A concentração de EvCI que inibe 50% da atividade da quimotripsina (IC_{50}) foi determinada pela construção de uma curva de titulação que relaciona percentual de inibição da quimotripsina e concentração de EvCI. Na construção dessa curva, alíquotas com concentrações crescentes de inibidor (0,027 μM , 0,053 μM , 0,27 μM , 0,58 μM , 0,9 μM) foram incubadas com alíquotas de 20 μL de quimotripsina (0,08 μM) e o ensaio foi realizado como descrito no item 3.2.3.2. O percentual de inibição da atividade da quimotripsina para cada concentração de inibidor foi utilizada para na construção de uma curva de titulação e determinação do IC_{50} .

3.2.5.4.2 Determinação da relação molar inibidor-enzima

A relação estequiométrica entre EvCI e quimotripsina também foi determinada construindo uma curva de titulação, relacionando a atividade residual da quimotripsina e a relação molar inibidor-enzima. Para a construção da curva foram utilizadas concentrações crescentes de inibidor (0,026 μM ; 0,053 μM ; 0,1 μM ; 0,21 μM ; 0,26 μM ; 0,37 μM ; 0,48 μM ; 0,64 μM) e uma concentração fixa de quimotripsina (0,08 μM), o ensaio foi realizado como descrito no item 3.2.3.2. A extrapolação da curva de titulação (atividade residual da quimotripsina x relação molar inibidor enzima) indica a estequiometria de ligação entre inibidor e enzima.

3.2.5.4.3 Determinação da constante de inibição e do mecanismo de inibição

Para determinar o mecanismo de inibição foi construído o gráfico de Lineweaver-Burk, onde o eixo das abscissas (X) corresponde ao inverso dos valores da concentração de substratos e o eixo das ordenadas (Y) corresponde ao inverso do valores da velocidade máxima.

Para a construção do gráfico, alíquotas de 50 μL , 100 μL , 150 μL , 200 μL , 250 μL e 300 μL da solução com EvCI, correspondendo a 1,1 μM ; 2,2 μM ; 3,3 μM ; 4,4 μM ; 5,5 μM e 6,6 μM de proteína respectivamente, foram incubadas com 20 μL de solução de quimotripsina (0,1 mg/mL Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl_2 20 mM) e 200 μL de solução de Azocaseína com concentrações crescentes (0,02 mM, 0,03 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM e 0,13 mM). Para o controle positivo, alíquotas de 20 μL de solução de quimotripsina (0,1 mg/mL Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 contendo CaCl 20 mM) foram incubadas com as concentrações crescentes de Azocaseína em volumes de 200 μL , sem a adição da fração inibidora. Os ensaios foram realizados como descrito em 3.2.3.

O valor da constante de inibição (K_i) foi determinado de acordo com Dixon *et al.*, 1979. O ensaio enzimático com quimotripsina para a determinação de K_i foi realizado na presença de concentrações crescentes de EvCI (1,1 μM ; 2,2 μM ; 3,3 μM ; 4,4 μM ; 5,5 μM e 6,6 μM) e duas diferentes concentrações de Azocaseína (0,02 mM e 0,08 mM). O valor de K_i foi obtido da intercessão de duas linhas correspondentes às concentrações do substrato.

3.2.5.5 Especificidade do inibidor para proteases serínicas e cisteínicas

3.2.5.5.1 Inibição da tripsina

Para avaliar a atividade anti-tríptica do inibidor foi utilizado o ensaio com Bapna descrito anteriormente.

3.2.5.5.2 Inibição da papaína

A atividade inibitória sobre a papaína foi mensurada utilizando ensaio com o substrato sintético específico (BANA).

Para o ensaio com BANA, a enzima foi pré-incubada por 10 minutos a 37 °C em tampão fosfato 250 mM, pH 6,0, solução ativadora para papaína (tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0, contendo 3 mM de DTT e 2 mM de EDTA) e 100 µL do inibidor (4,8 µg de proteína). A reação foi iniciada com a adição de 200 µL de BANA, prosseguindo por 20 minutos. Para parar a reação, foram utilizados 500 µL de HCl 2% em etanol. Em seguida, foi adicionado o corante (0,06 % de *p*-Dimetilaminocinamaldeído em 100 mL de etanol). O resultado do ensaio foi mensurado utilizando a absorbância de 540 nm..

3.2.5.5.3 Inibição da elastase pancreática

A atividade inibitória sob elastase pancreática foi avaliada utilizando-se ensaio com Azocaseína. Cerca de 20µL da enzima (2,9 mg/mL) foi incubada por 15 minutos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e 100 µL do inibidor (4,8 µg de proteína). A reação foi então iniciada adicionando-se 200 µL de Azocaseína 1%. A reação foi finalizada após 30 minutos com 300 µL de TCA 20%. O material foi então centrifugado por 10 minutos a 12000 x *g* e depois o sobrenadante foi alcalinizado com NaOH 2N. Foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 440 nm.

3.2.5.5.4 Inibição para elastase neutrofílica

Para o ensaio de inibição, a solução contendo a enzima elastase neutrofílica foi centrifugada por 10 minutos a 10000 x *g* a 4 °C. O sobrenadante foi então utilizado para o ensaio. Uma alíquota de 100 µL da enzima (0,5 µg/µL) foi incubada com 100 µL de inibidor (3,2 µg) e 350 µL de tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico (1:1), pH 7,4, por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, a reação foi iniciada com a adição de 5 µL de substrato SAAvpNA (125 µM). Após 75 minutos a reação foi parada com a adição de 250 µL de ácido acético 2%. Os tubos foram centrifugados

por 10 minutos, a 10000 x *g* a 4°C, e então foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 405 nm.

3.2.5.6 Estabilidade do inibidor em diferentes valores de pH

Para determinar a atividade inibitória em diferentes valores de pH, alíquotas de 2,5 mL do inibidor foram dialisadas por 16 horas contra tampões com pH entre 2 e 12. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 60 minutos nos mesmos tampões. Os tampões utilizados foram: Glicina-HCl (pH 2 e 3), Fosfato de Sódio (pH 6 e 8) e Glicina-NaOH (pH 11 e 12). A concentração de todos os tampões foi de 100 mM. Após quatro horas de diálise contra Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, a atividade inibitória foi testada utilizando 14 µg do inibidor em 300 µL. O ensaio foi realizado como descrito no item 3.2.3.2, em triplicata

3.2.5.7 Estabilidade térmica do inibidor

Para avaliar a influência da temperatura sobre a atividade inibitória, alíquotas de 2,5 mL de EvCI foram incubadas em banho-maria por 30 minutos nas seguintes temperaturas: 37 °C (controle), 40 °C, 60 °C, 70 °C, 90 °C e 100 °C. Após resfriamento das amostras a 4 °C, alíquotas de 300 µL (14 µg de proteína) foram utilizadas no ensaio anti-quimotriptico como descrito no item 3.2.3.2, para avaliação da estabilidade térmica de EvCI. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

3.2.5.8 Estabilidade na presença do agente redutor DTT

Para avaliar a estabilidade do inibidor de quimotripsina de sementes de *E. veluntina* (EvCI) na presença de agente redutor, seguiu-se a metodologia descrita por (). Amostras de inibidor (2,0 mL, contendo 480 µg de proteína) foram incubadas a 37 °C em soluções de DTT em concentrações finais de 1 mM, 10 mM e 100 mM por 15, 30, 60 e 120 minutos. A reação foi parada pela adição de iodoacetamida, na quantidade de duas vezes a concentração final de DTT. Após o período de incubação, a mistura de reação (300 µL da mistura de reação contendo 14 µg do inibidor) foi submetida ao ensaio de atividade anti-quimotriptica para avaliar a

capacidade inibitória de EvCl. Os estudos para avaliação da estabilidade de EvCl na presença de DTT foram realizados em triplicata (item 3.2.3.2.), com provas em branco e acompanhados por controle sem DTT.

3.2.6 Cultura de células

As linhagens de células HeLa, MDA e HepG2 foram cultivadas em meio DMEM, enquanto que K562 e PC3 foram cultivadas em RPMI 1640 ambos suplementados com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. As células HeLa, MDA e HepG2 foram semeadas (3×10^3 células/mL), K562 (2×10^4) e PC3 (2×10^4) em microplacas de cultivo de 96 poços e incubadas por um período de 72 horas com concentrações de EvCl que variaram de (0,0005 a 200 µg/mL).

3.2.7 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O teste do MTT avalia a integridade mitocondrial das células testadas baseado na redução enzimática do corante até o produto chamado formazan pelas desidrogenases mitocondriais. Após o período de tratamento de 72 horas com as diferentes concentrações de EvCl, as células foram incubadas em meio de cultura contendo 1 mg/mL de MTT por 3 horas e posteriormente lavadas com etanol por cinco minutos para solubilização do formazan. A absorbância das amostras foi monitorada a 570 nm.

3.2.8. Análise por citometria de fluxo

3.2.8.1. Avaliação de morte celular utilizando-se marcação com anexina V/PI

Após exposição a 0,005 µg/mL e 50 µg/mL de inibidor por 72 h, as células HeLa foram coletadas e lavadas com PBS gelado. A seguir, 1×10^6 células foram ressuspendidas em 100 µL de Binding buffer 1X [0,1 M Hepes (pH 7,4); 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂] e transferidas para tubos de citometria. As amostras foram incubadas com 3 µL de anexina V conjugada com FITC e 25 µg/mL de PI por 15 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. A seguir, foram adicionados 300 µL de

Binding buffer 1X e as amostras foram analisadas (10.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACSCalibur usando-se o programa CellQuest 2.8. (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A análise da porcentagem celular das diferentes populações marcadas foi realizada utilizando-se o programa CellQuest 2.8. Os dados foram representados como média \pm DP e os testes foram realizados em duplicata

3.2.8.2. Avaliação do ciclo celular

Para avaliação dos efeitos do inibidor sobre o ciclo celular, as células HeLa foram incubadas por 24 h em meio DMEM sem soro para sincronização, em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. A seguir, o meio foi removido e as células foram tratadas por 72 h com 0,005 μ g/mL e 50 μ g/mL de inibidor em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após o tratamento, as células foram coletadas, lavadas 2 vezes com PBS gelado e transferidas para tubos tipo Eppendorf. Para análise do ciclo celular, 1×10^6 células foram fixadas com paraformaldeído 2% em PBS (v/v) a 4°C, permeabilizadas com saponina 0,01% e tratadas com 4 μ g/mL de RNase por 1 h a 37°C. A seguir, as células foram ressuspensas em PBS em tubos de citometria, marcadas com 25 μ g/mL de PI e analisadas (10.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACSCalibur usando-se o programa CellQuest 2.8 (BD). O conteúdo de DNA foi avaliado utilizando-se um detector FL2 em escala linear. Para eliminar agregados celulares, a população celular a ser analisada foi selecionada de um histograma mostrando a área (FL2A) versus a largura (FL2W) do sinal FL2. A análise da porcentagem celular nas diferentes fases do ciclo celular (sub-G1, G0/G1 e S/G2/M) foi realizada utilizando-se o programa WinMDI 2.8. Os dados foram representados como média \pm DP e os testes foram realizados em duplicata.

3.2.9. Análise estatística.

Todos os dados representam pelo menos três experimentos independentes e foram expressos com média \pm DP (Desvio Padrão) exceto fosse indicado de outra maneira. As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste ANOVA e pelo

teste de Tukey e Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

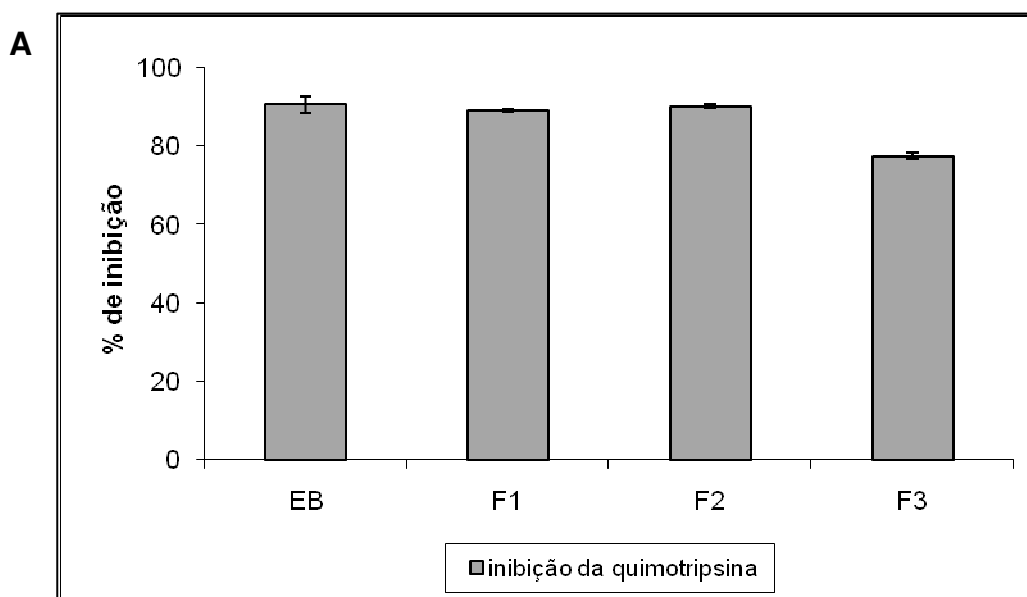
4.1 Isolamento e purificação do inibidor de quimotripsina de sementes de *E. velutina*

4.1.1 Determinação da atividade inibitória sobre as proteases serínicas, tripsina e quimotripsina, nas frações protéicas de *E. velutina*

O extrato de proteínas totais da semente de *E. velutina* foi fracionado de acordo com a percentagem de saturação de sulfato de amônio nas frações F1 (0-30%), F2 (30-60%) e F3 (60-90%). Após o fracionamento, foi avaliada a atividade inibitória sobre tripsina e quimotripsina no extrato bruto e nas diferentes frações.

O extrato bruto inibiu em 90,69 % \pm 2,12 a atividade da quimotripsina. E dentre as frações, F1 e F2 apresentaram percentuais de inibição muito semelhantes, no entanto F2 teve maior atividade inibitória sobre a quimotripsina com um percentual de inibição de 90,26 % \pm 0,5. (Figura 3A).

Em relação à inibição da tripsina, o extrato bruto inibiu em 100 % a atividade da enzima, e a fração que apresentou o maior percentual de inibição foi a F3 (94,84 % \pm 3,24) (Figura 3B).



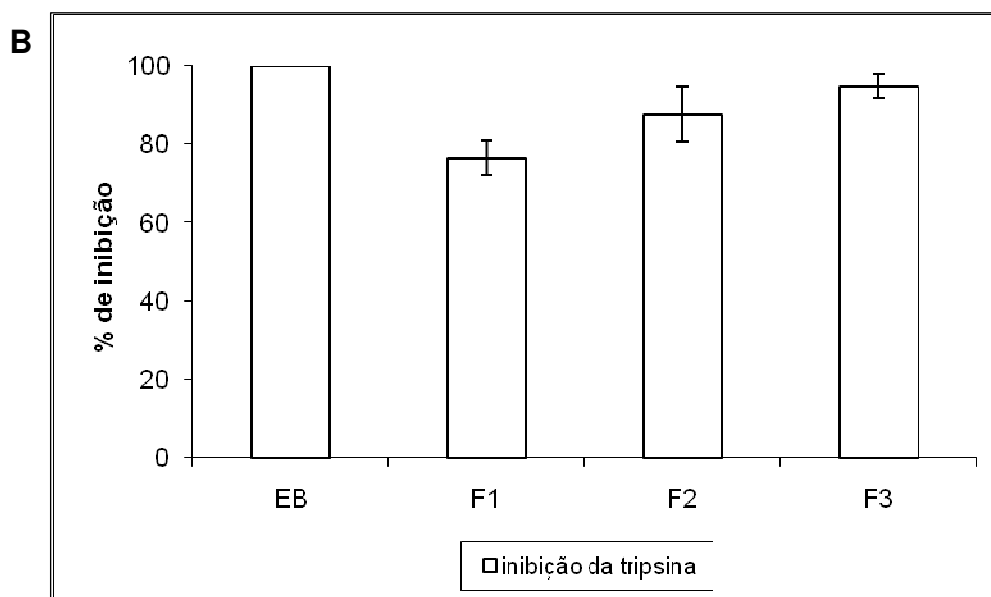


Figura 3. Inibição da atividade de quimotripsina e tripsina pelas frações protéicas de sementes de *E. velutina*. A. Inibição da quimotripsina, utilizando-se 100 μ L de cada fração protéica e Azocaseína 1%, pH 7,5 como substrato protéico. B. Inibição da tripsina, utilizando-se 100 μ L de cada fração protéica e BAPNA como substrato.

4.1.2 Cromatografia de afinidade em coluna de Tripsina-Sepharose CL 4B

A fração F2 foi dialisada contra Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e então aplicada na coluna de afinidade Tripsina-Sepharose, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Esse passo da purificação teve como objetivo excluir os inibidores de tripsina presentes na fração F2 que poderiam inibir também quimotripsina e, conseqüentemente, serem adsorvidos na coluna de afinidade de Quimotripsina-Sepharose, o segundo passo de purificação. Para determinar a capacidade da coluna, foi feita uma curva com a coluna de Tripsina-Sepharose aplicando diferentes quantidades de F2. As quantidades de proteínas escolhidas para aplicar na coluna foram 7 mg, 21 mg e 35 mg. O material não-retido na coluna foi eluído com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e o retido com HCl 5 mM. Após a afinidade, para avaliar a presença do inibidor de tripsina no eluato da coluna, foi realizado o ensaio de inibição para tripsina. Também foi feito o ensaio de inibição para quimotripsina para avaliar a atividade inibitória para quimotripsina no eluato.

As frações não-retidas das afinidades nas quais foram aplicadas 21 mg e 35 mg de proteína apresentaram inibição para tripsina com picos de 38,23% e

98,37%, respectivamente (Figuras 4A e 4B). Apenas o não-retido da afinidade onde foi aplicado 7 mg de proteína não apresentou inibição da tripsina, sendo a quantidade de proteína que não satura a coluna (Figura 4C). Nas três cromatografias, o material retido na coluna inibiu aproximadamente 100 % da atividade para tripsina, o que comprova a ligação do inibidor de tripsina à matriz da coluna (Figura 4).

Em relação à atividade inibitória da quimotripsina, os não-retidos das três afinidades inibem a quimotripsina (Figura 4). Isso demonstra que o responsável pela atividade inibitória da quimotripsina presente em F2 não se liga à coluna de Tripsina-Sepharose.

Após ser constatado que o não-retido da afinidade onde foi aplicado 7 mg de proteína apresentava apenas atividade anti-quimotríptica, essa concentração foi utilizada no passo seguinte de purificação, a coluna de afinidade de Quimotripsina-Sepharose.

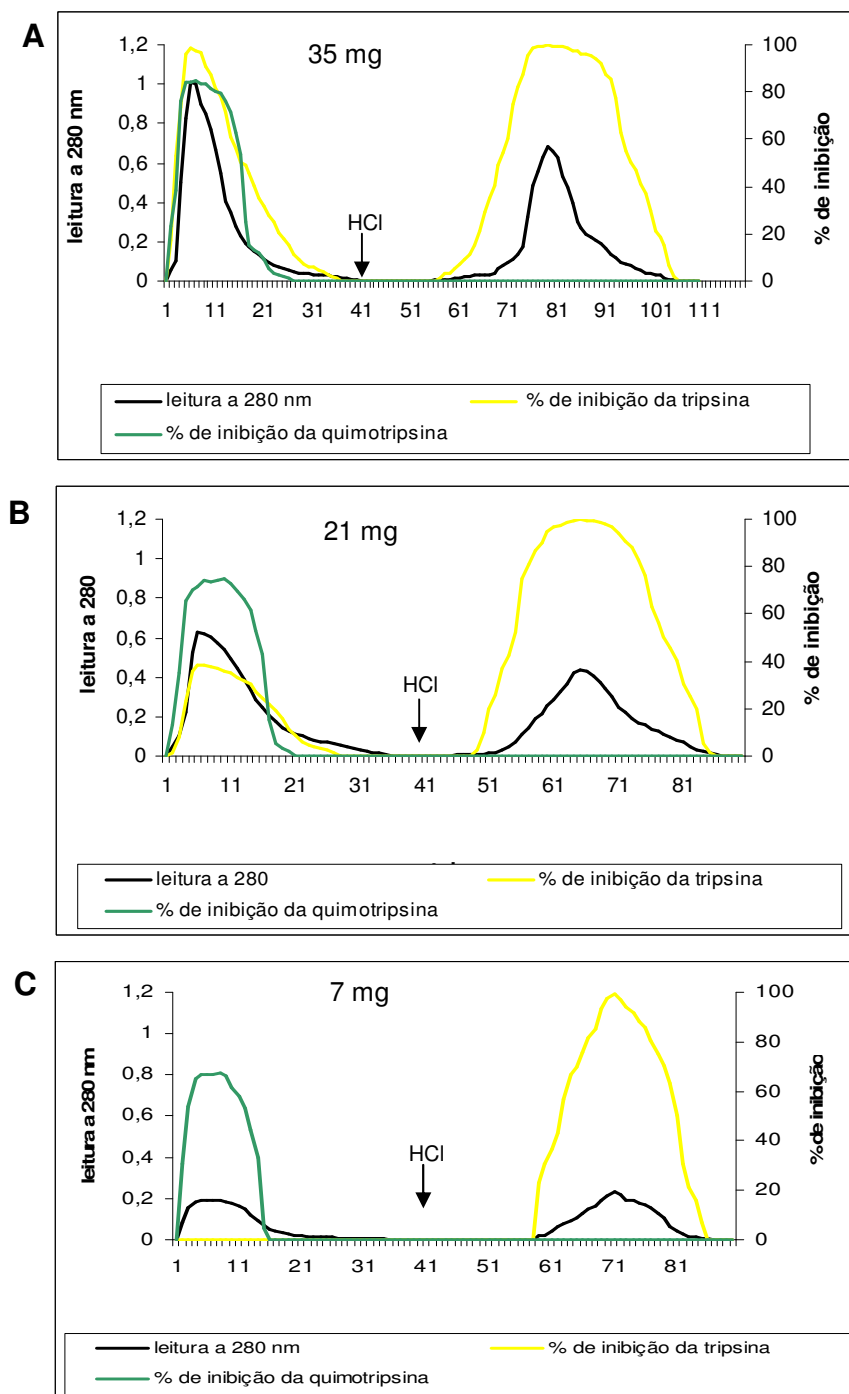


Figura 4. Perfil de Eluição de F2 em Coluna de Afinidade Tripsina-Sepharose: A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Proteínas adsorvidas foram eluídas com HCl 5 mM e as frações proteicas (2,0 mL/tubo) foram monitoradas a 280 nm. A atividade inibitória sobre a tripsina foi avaliada, com BApNA como substrato; e para quimotripsina, utilizou-se Azocaseína como substrato. Utilizou-se 100 μ L das frações para os ensaios de inibição. A foram aplicados 35 mg de proteína; B 21 mg de proteína e C 7 mg de proteína.

4.1.3 Cromatografia de afinidade em coluna de Quimotripsina-Sepharose 4B

Após a aplicação de 7 mg de proteína da fração F2 na coluna de afinidade de Tripsina-Sepharose, as proteínas não retidas nessa coluna e eluídas com Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 foram aplicadas na coluna de afinidade de Quimotripsina-Sepharose. A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão.

As proteínas retidas na coluna e liberadas após a aplicação de HCl 5 mM formaram um pico único com leitura de absorbância máxima de 0,105 a 280 nm (Figura 5). O material desse pico foi dialisado contra Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e foi então realizado o ensaio de inibição da quimotripsina. Foram utilizados 100 μ L do inibidor e Azocaseína como substrato protéico. Como resultado obteve-se um pico de inibição de 86,15 % da atividade da quimotripsina (Figura 5).

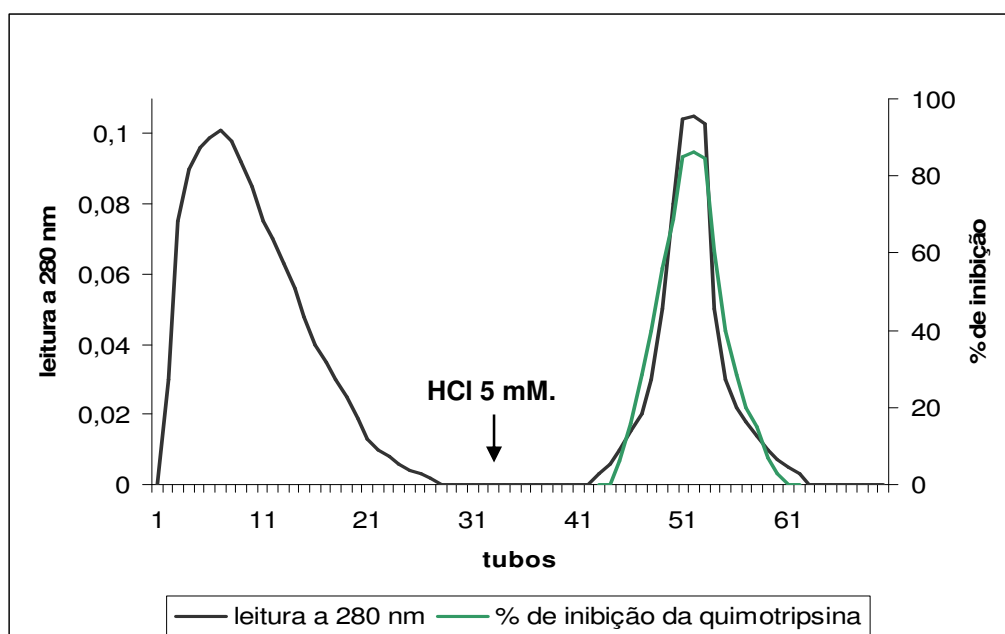


Figura 5. Perfil de eluição do material não-retido em Tripsina-Sepharose de F2 em coluna de Quimotripsina-Sepharose. Foram aplicados aproximadamente 4 mg de proteína. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. Proteínas adsorvidas foram eluídas com HCl 5 mM e as frações proteicas (2,0 mL/tubo) foram monitoradas a 280 nm. A atividade inibitória sobre a quimotripsina foi realizada usando 100 μ L do inibidor para os ensaios de inibição com Azocaseína como substrato.

4.1.4 Cromatografia de fase reversa em coluna uRPC18 (Sistema de Purificação FPLC/AKTA)

A fração proteica correspondente ao material retido na coluna de afinidade de quimotripsina foi aplicada na coluna de fase reversa uRPC18, no sistema FPLC/AKTA, previamente equilibrada com TFA 0,1% (em H₂O). Um pico proteico predominante, com atividade anti-quimotríptica, foi eluído com gradiente linear de acetonitrila de (50-70%), que corresponde ao inibidor de *E. velutina* purificado, foi denominado EvCl. (Figura 6).

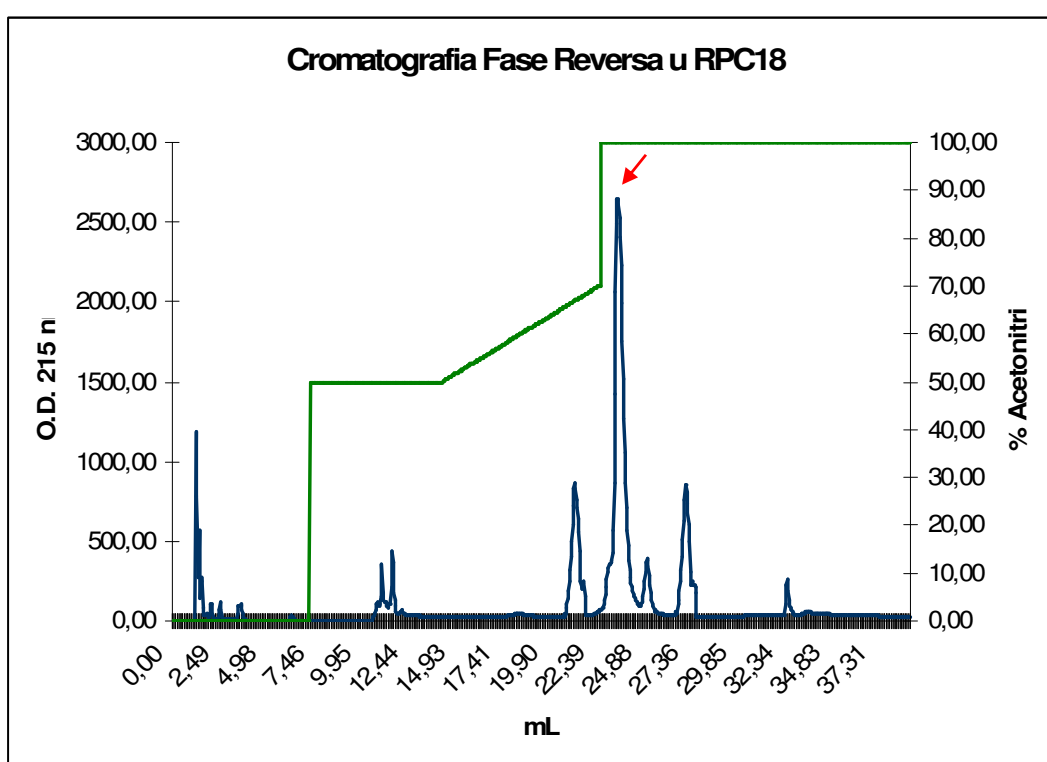


Figura 6. Perfil Cromatográfico de EvCl na Coluna de Fase reversa C18 em sistema de FPLC-AKTA. A coluna foi previamente equilibrada com 0,1% TFA em H₂O. As frações (0,5 mL/tubo) foram monitoradas a 215nm. O pico, indicado pela seta, apresentou atividade inibitória contra quimotripsina, representando o inibidor purificado.

4.2 Purificação do inibidor de quimotripsina de EvCl

A partir dos volumes das frações obtidas em cada passo de purificação, de suas respectivas quantificações de proteína e unidades inibitórias (UI) foi construída uma Tabela de purificação de EvCl (Tabela 4). O extrato bruto (EB), obtido na primeira etapa do processo de purificação, foi utilizado como parâmetro

para as demais frações protéicas. O valor de purificação 1 e o rendimento de 100% foram atribuídos a essa fração. O grau de purificação das demais frações foi calculado como sendo a razão entre sua atividade específica e a do extrato bruto. E a percentagem de rendimento das demais frações foi calculada com base na razão entre a sua atividade inibitória e a atividade inibitória do extrato bruto. A atividade específica foi calculada como a razão entre a atividade inibitória da fração e o valor da proteína total dessa fração. A Tabela 4 mostra que o grau de purificação de EvCI foi de 375 vezes, com uma recuperação de 0,002% no último passo de purificação.

Tabela 4 – Etapas de purificação de EvCI.

Etapas	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade inibitoria total	Atividade Específica (UI/mg)	Purificação (X)	Recuperação (% UI)
Extrato Bruto	160	1862,4	3648	2	1	100
F2	51	407,18	1158	2,9	1,5	22
Afinidade tripsina (Não-retido)	47	3,84	712	185,4	92,7	0,2
Afinidade Quimotripsina	11	0,385	165	428,6	214,3	0,02
Fase reversa C18	2,0	0,04	30	750	375	0,002

Uma unidade de inibidor foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a atividade da enzima em 0,01 da absorbância a 410 nm.

4.3 Caracterização bioquímica

4.3.1 Eletroforese

As diversas etapas de purificação do inibidor de *E. velutina* foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE 12% (Figura 7). Uma única banda corada por *Comassie blue* foi observada, revelando que, de fato, o inibidor foi purificado.

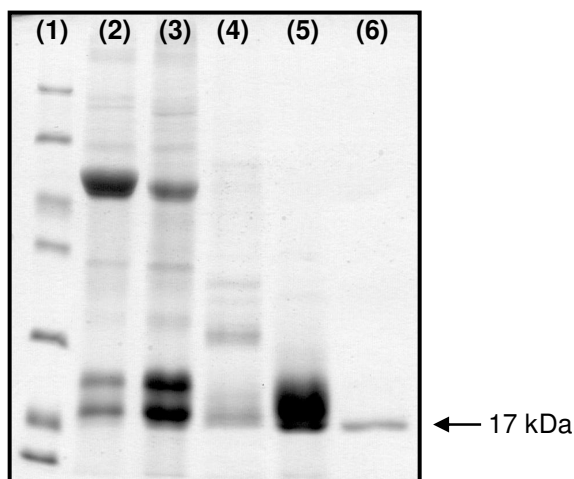


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida 1- marcador. Marcadores moleculares: (a) β -galactosidase (116,0); (b) Albumina Sérica Bovina (66,2); (c) Ovalbumina (45,0); (d) Lactato desidrogenase (35,0), (e) Endonuclease de restrição BAP 981 (25,0); (f) β -lactoglobulina (18,4) e (g) Lisozima (14,4). 2 Extrato Bruto; 3 F2; 4 Não Retido de Tripsina; 5 Retido quimotripsina; 6 EvCl purificada.

4.3.2 Determinação da massa molecular

A massa molecular aparente de EvCl foi calculada a partir da corrida eletroforética no último passo da purificação (Figura 7). Por SDS-PAGE foi possível observar uma banda proteica que apresentou uma massa molecular de aproximadamente 17 kDa, calculada por regressão linear (Figura 8), tendo por base padrões proteicos de massas moleculares conhecidas.

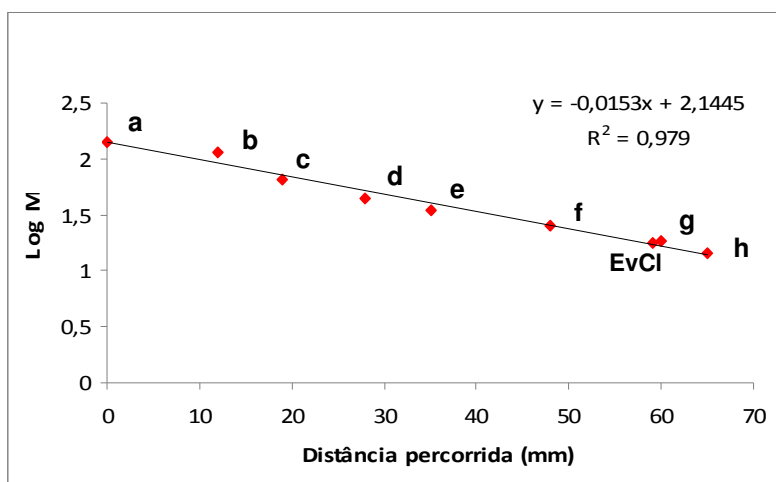


Figura 8. Determinação da massa molecular aparente das cadeias polipeptídicas de EvCl a partir de migração em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. (a) β -galactosidase (116,0); (b) Albumina Sérica Bovina (66,2); (c) Ovalbumina (45,0); (d) Lactato desidrogenase (35,0), (e) Endonuclease de restrição BAP 981 (25,0); (f) β -lactoglobulina (18,4) e (g) Lisozima (14,4). As proteínas foram coradas com Comassie blue. Determinação da massa molecular das subunidades de EvCl (~17,89 kDa). Log Mr – logaritmo da massa molecular, De/D0 – relação entre a distância percorrida pela proteína no gel e o comprimento total do gel.

4.3.3 Determinação do ponto isoelétrico (pI) e sequência do inibidor

Para determinar se EvCl apresenta isoformas e se ele é um inibidor ácido ou básico foi realizada uma eletroforese bidimensional. A focalização isoelétrica mostrou a presença de quatro isoformas, todas com pls ácidos: 5,06; 4,42; 4,63 e 4,83 (Figura 9). Todas apresentaram massa molecular de 17 kDa.

A identificação do inibidor de quimotripsina de sementes de *Erythrina velutina* pela “impressão digital” de peptídeos, analisada por espectrometria de massa, mostra 100% de identidade com a sequência de ECI, inibidor de quimotripsina de *E variegata*. A proteína total apresenta 179 aa (NCBI identidade de acesso gi|2129823). Os peptídeos correspondem a 13,96 % (25 aa) da proteína total (Figura 10).

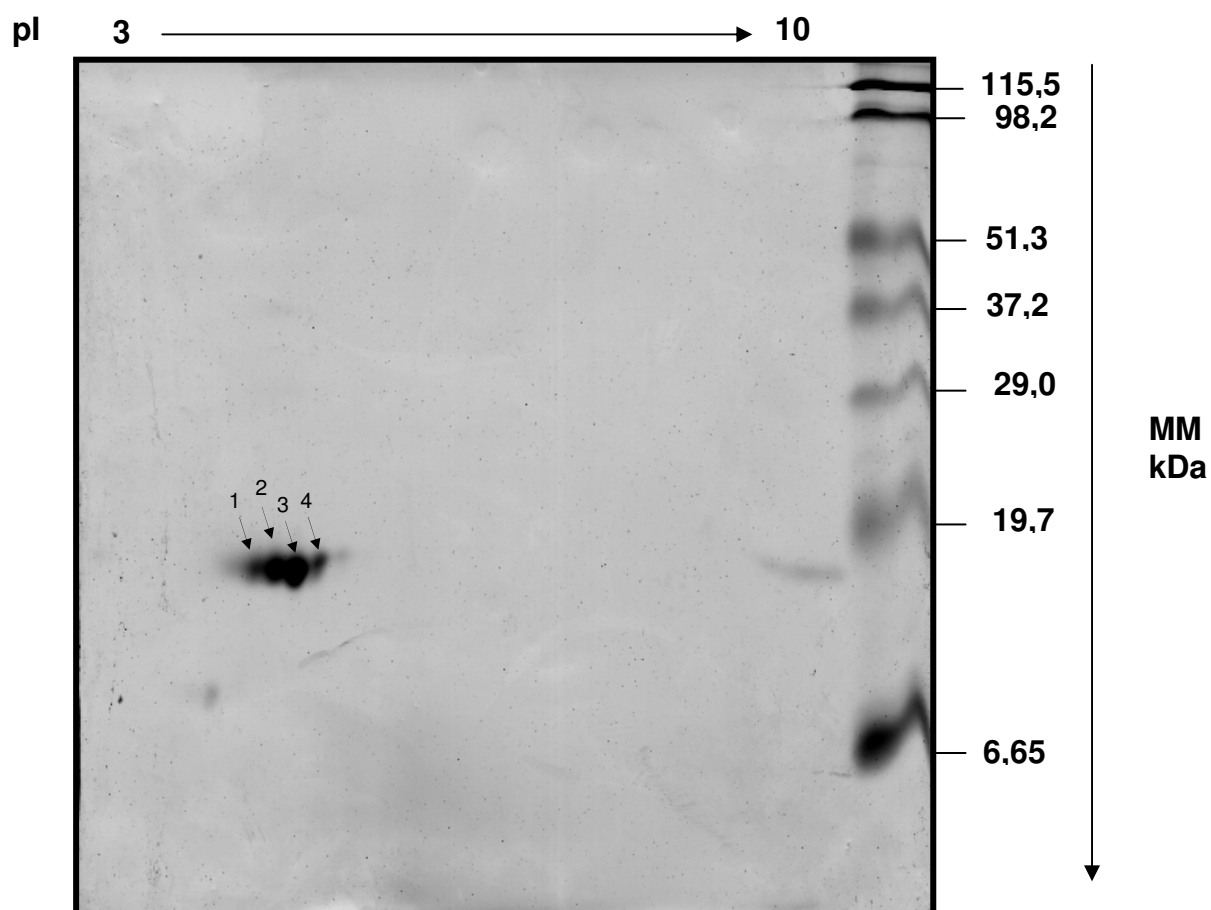


Figura 9. Eletroforese bidimensional. M – marcador Marcadores moleculares: β -galactosidase (115,5 kDa); Albumina sérica bovina (98,2 kDa); Ovalbomina (51,3 kDa); Anidrase carbônica (37,2 kDa); Inibidor de Tripsina da soja (29,04 kDa); Lizosima (19,7 kDa); Aprotinina (6,65 kDa).

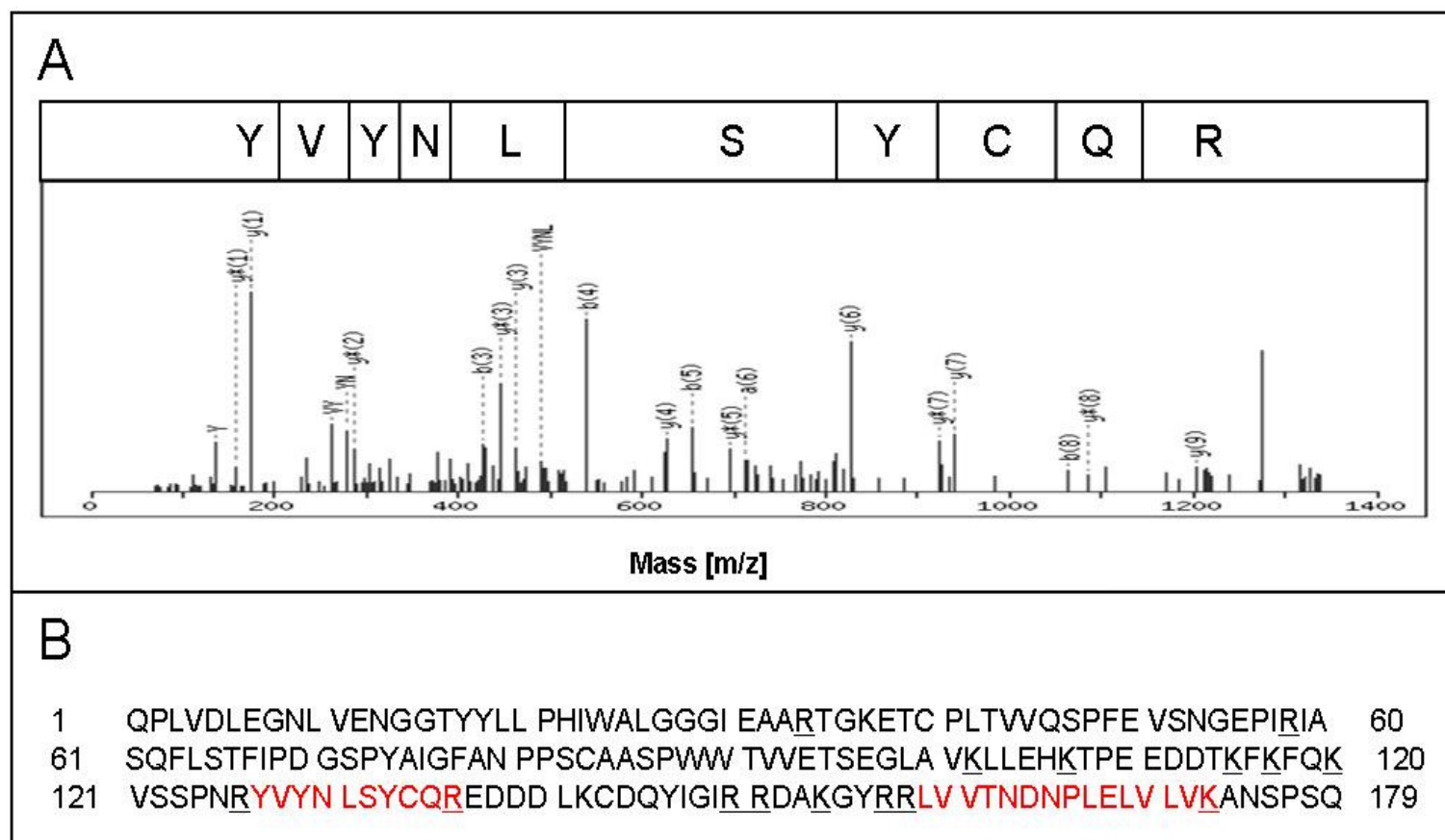


Figura 10 - Identificação de EvCI por impressão digital de peptideos (peptides fingerprint analysis). A - Espectro de fragmentação por espectrometria de massas do peptídeo (MS). B – Sequência de aminoácidos do inibidor de quimotripsina, ECI, de sementes de *E. variegata*, os peptídeos em vermelho correspondem aos peptídeos coincidentes com os obtidos do inibidor de *E. velutina*, com 100% de identidade, os resíduos sublinhados correspondem aos sítios de clivagem da tripsina, utilizada na digestão enzimática. Identificação do inibidor de quimotripsina de sementes de *Erythrina velutina* por impressão digital de peptideos A proteína total apresenta 179 aa (NCBI identidade de acesso gi|2129823). Os peptídeos correspondem a 13,96 % (25 aa) da proteína total.

4.3.4. Determinação do IC₅₀

Para determinar qual a concentração de EvCI que inibe 50% da atividade da quimotripsina (IC₅₀) foi construída uma curva de titulação. Na construção dessa curva, alíquotas com concentrações crescentes de inibidor (0,027 μM , 0,053 μM ,

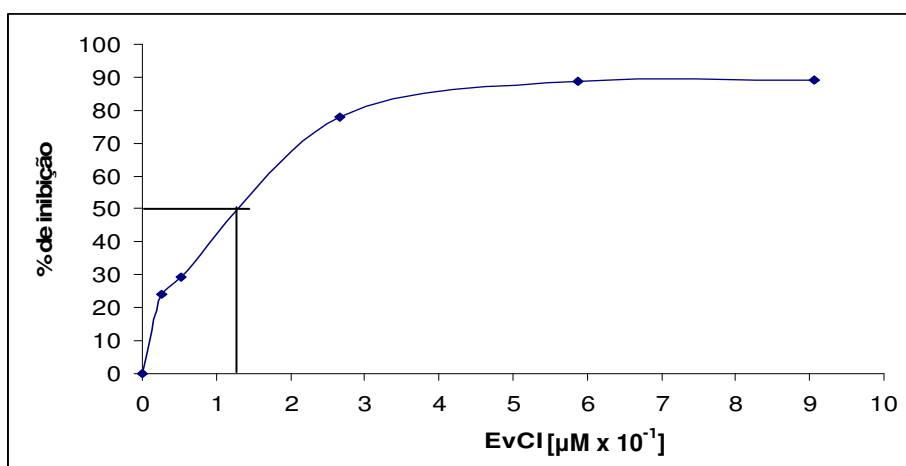


Figura 11. Determinação do IC₅₀ de EvCI. Curva de titulação utilizando concentrações crescentes de EvCI: 0,027 μM , 0,053 μM , 0,27 μM , 0,58 μM , 0,9 μM e concentração fixa de quimotripsina.

0,27 μM , 0,58 μM , 0,9 μM) foram incubadas com alíquotas de 20 μL de quimotripsina (0,08 μM). Foi determinado o percentual de inibição da atividade da quimotripsina para cada concentração de inibidor utilizada e construída a curva de titulação (Figura 11). De acordo com a titulação, o IC₅₀ de EvCI é de $1,3 \times 10^{-7} \text{M}$. Outro ponto importante determinado pela curva de titulação é que o percentual máximo de inibição da quimotripsina atingido por EvCI é em torno de 89%.

4.3.5. Determinação da relação molar inibidor-enzima

A relação estequiométrica entre EvCI e quimotripsina também foi determinada construindo uma curva de titulação com concentrações crescente de inibidor (0,026 μM ; 0,053 μM ; 0,1 μM ; 0,21 μM ; 0,26 μM ; 0,37 μM ; 0,48 μM ; 0,64 μM) e uma concentração fixa de quimotripsina (0,08 μM). Foi feita a relação molar entre inibidor e enzima para cada concentração de inibidor utilizada. De acordo com a curva de titulação (Figura 12), a relação estequiométrica entre EvCI e quimotripsina é de 1:1.

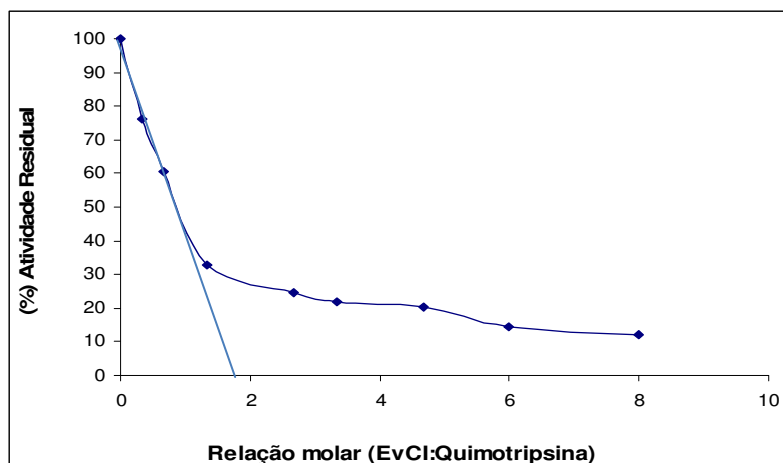


Figura 12. Determinação da relação molar entre EvCI e a quimotripsina. Curva de titulação construída com concentrações crescentes de inibidor (0,026 μM ; 0,053 μM ; 0,1 μM ; 0,21 μM ; 0,26 μM ; 0,37 μM ; 0,48 μM ; 0,64 μM) e concentração fixa de quimotripsina (0,08 μM) .

4.3.6 Determinação da constante de inibição e do mecanismo de inibição

Após realização de ensaios com concentrações variáveis de inibidor e substrato (Azocaseína) foi construído o gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk, para a determinação do tipo de inibição proporcionado por EvCI sobre a quimotripsina. A Figura 13 mostra que EvCI inibiu a quimotripsina de modo competitivo. Esse tipo de inibição é caracterizado pela inalteração da velocidade máxima (dada pela intersecção da reta com o eixo Y) e mudança no valor de K_m (Constante de Michaelis-Menten), dada pela intersecção da reta com o eixo X.

Para a determinação do valor da constante de inibição (K_i) foi feito o gráfico de Dixon (Dixon *et al.*, 1979). Nesse gráfico (Figura 14) está representada a inibição da quimotripsina por EvCI (concentrações crescentes) em ensaios utilizando Azocaseína com concentrações de 0,02 mM e 0,08 mM. A análise do gráfico confirma que EvCI inibe a quimotripsina de modo competitivo e com um valor de K_i de 4×10^{-8} M.

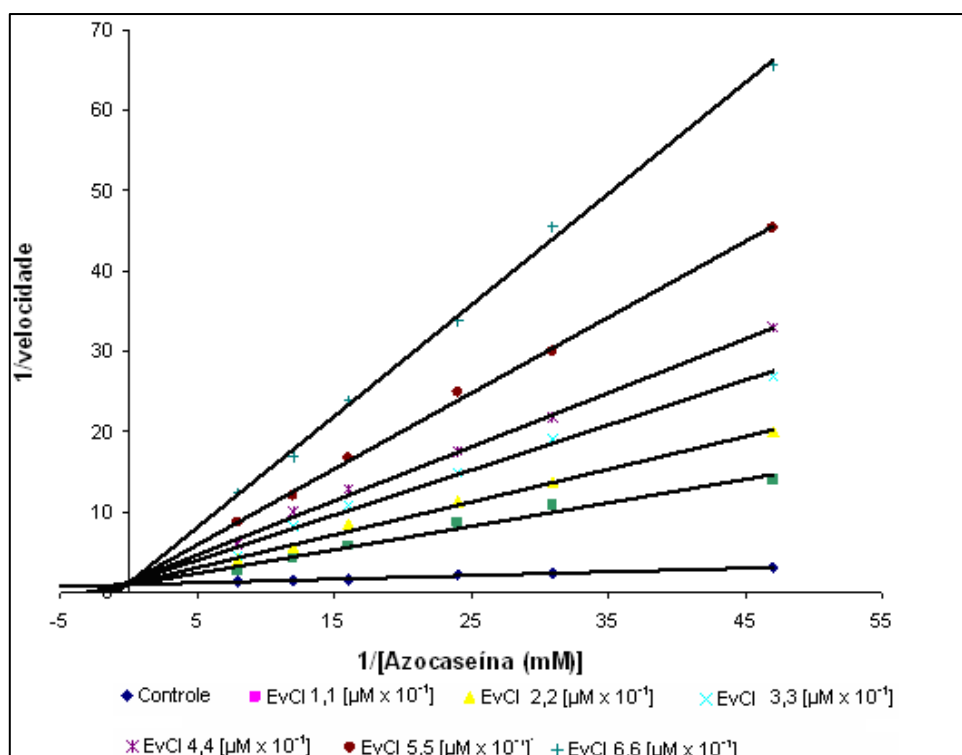


Figura 13. Mecanismo de inibição de EvCI sobre a atividade da quimotripsina. A atividade inibitória de EvCI foi determinada por ensaio cinético utilizando várias concentrações de Azocaseína (0,02 mM, 0,03 mM, 0,04 mM, 0,06 mM, 0,08 mM e 0,13 mM) e ilustrada através do gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. O valor da velocidade foi determinado por $V = \text{DO440}/\text{h/mL}$.

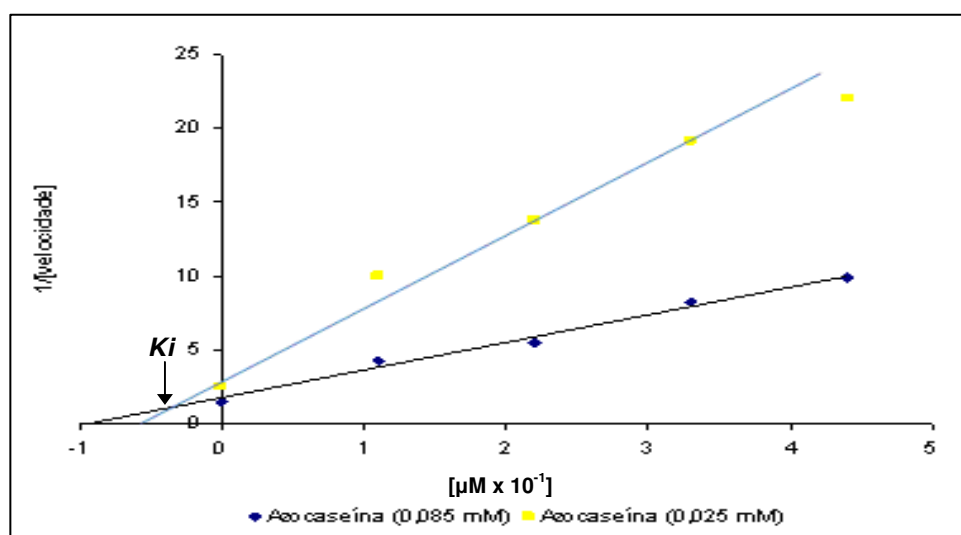


Figura 14. Determinação do valor de K_i de EvCI. A constante de inibição (K_i) de EvCI sobre a quimotripsina foi determinada pelo método de Dixon *et al.*, 1979. O valor de K_i foi obtido dos interceptos das retas das duas concentrações de substrato utilizadas. O valor da velocidade foi determinado por $V = \text{DO440}/\text{h/mL}$.

4.3.7 Especificidade para proteases serínicas e cisteínicas

Para determinar a especificidade do inibidor de EvCI foram realizados ensaios de inibição contra as demais enzimas serínicas e cisteínicas utilizando 4,8 µg do inibidor. Como pode-se observar na Tabela 5, a maior atividade inibitória de EvCI é para a quimotripsina ($89,16\% \pm 6,31$). Após a quimotripsina, o segundo maior percentual de inibição é para a elastase neutrofílica ($35,91\% \pm 7,91$). EvCI não apresentou inibição significativa sobre as outras proteases serínicas (tripsina e elastase pancreática). Em relação às proteases cisteínicas, também não há uma diminuição considerável da atividade da papaína (Tabela 5).

Tabela 5 – Especificidade de EvCI para enzimas serínicas e cisteínicas.

Enzima	Inibição
Quimotripsina	$89,16\% \pm 6,31$
Tripsina	$6,30 \pm 3,92$
Papaína	ND*
Elastase Pancreática	ND*
Elastase Neutrofílica	$35,91 \pm 7,91$

*ND- não detectado

4.3.8 Estabilidade em diferentes valores de pH

A atividade inibitória de EvCI permaneceu estável nos diferentes valores de pH. O maior percentual de inibição ($89,16\% \pm 2,42$) foi em pH 8. Em pH 2, o mais ácido, a inibição foi de $83,84\% \pm 0,26$ e em pH 12, o mais alcalino, foi de $79,57\% \pm 0,26$ (Figura 15). Este resultados demonstraram que variações de pH não influenciam a atividade inibitória de EvCI.

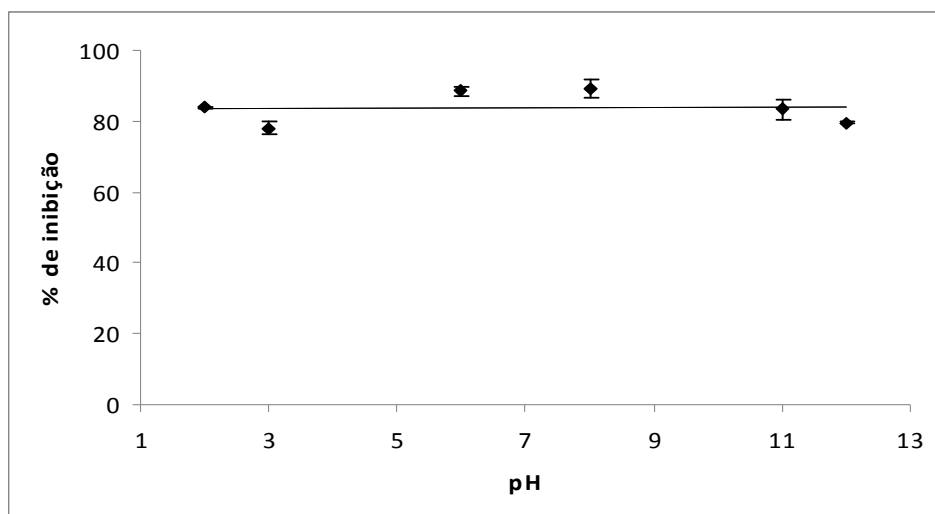


Figura 15. Estabilidade do inibidor EvCI à variação do pH.
pH: 2, 3, 6, 8, 11, 12. Foi utilizado 14 μg do inibidor para o ensaio de inibição.

4.3.9 Estabilidade térmica

Na Figura 16 é possível observar que o EvCI mostrou-se altamente estável quando submetido a tratamento térmico. A amostra controle de EvCI, não submetida ao tratamento térmico, inibiu a quimotripsina em $82,83\% \pm 0,74$. A amostra submetida à temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ inibiu $84,99 \pm 2,87$ e todas as outras amostras submetidas ao tratamento térmico apresentaram percentuais de inibição entre 83% e 86% (Figura 16). Em nenhum dos tratamentos houve perda significativa de atividade inibitória demonstrando que EvCI possui grande estabilidade térmica.

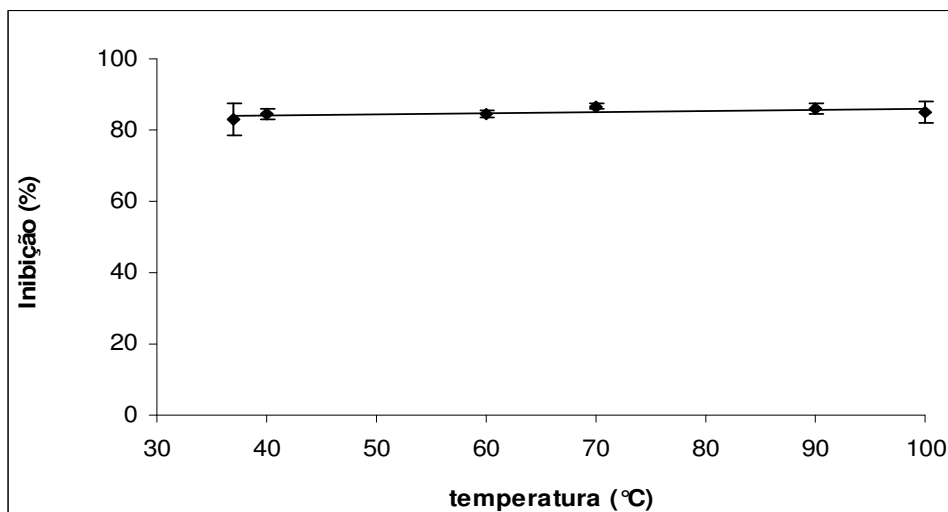


Figura 16. Estabilidade do inibidor de quimotripsina EvCl em diferentes temperaturas (37 °C, 40°C, 60°C, 70°C, 90°C e 100°C). Foi utilizado 14 µg do inibidor para o ensaio de inibição.

4.3.10 Estabilidade na presença de DTT

O DTT, nas concentrações de 1 mM e 10 mM, não influencia a atividade inibitória de EvCl. Para essas concentrações, não houve diminuição do percentual de inibição em nenhum dos tempos de incubação. Em relação à maior concentração de DTT, 100 mM, não houve alteração da atividade inibitória até 60 minutos de incubação. No entanto, quando o inibidor foi incubado por 120 minutos com 100 mM de DTT houve uma redução de sua atividade inibitória em aproximadamente 50% (Figura 17).

Esse resultado mostra que EvCl possui grande estabilidade ao agente redutor DTT, já que apenas na maior concentração do DTT e no maior tempo de incubação houve diminuição na sua atividade inibitória.

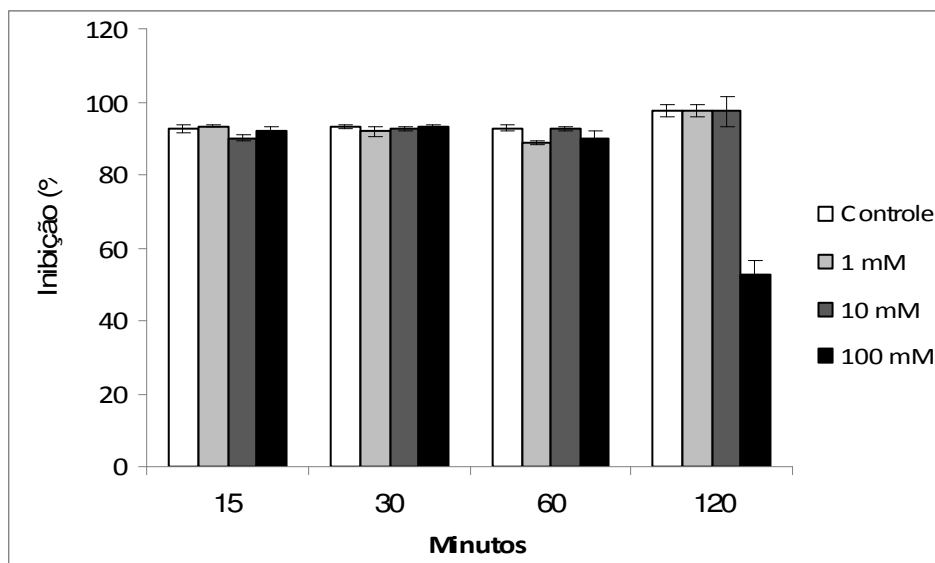


Figura 17. Estabilidade de EvCI ao agente redutor DTT. A atividade inibitória para quimotripsina foi ensaiada na presença de diferentes concentrações de DTT (1mM, 10mM, e 100mM) em diferentes tempos de incubação (15min, 30min, 60min e 120min). Foram utilizados 14 μ g de EvCI.

4.3.11 Citotoxicidade do EvCI em diferentes linhagens de células tumorais.

A viabilidade de células HeLa, MDA, K562, PC3 e HepG2 foram analisada após incubação por 72 horas com concentrações crescentes de EvCI (0,0005 a 200 μ g/mL). Após este período foi possível observar a diminuição da viabilidade das células HeLa de maneira dose dependente em resposta a EvCI. O valor de IC_{50} (a dose que diminui a viabilidade celular em 50%) foi obtido com a concentração de EvCI em 50 μ g/mL (Figura 18). Também apresentou um baixo efeito na viabilidade celular de células MDA. Entretanto não promoveu alteração na proliferação de K562, PC3 e HepG2.

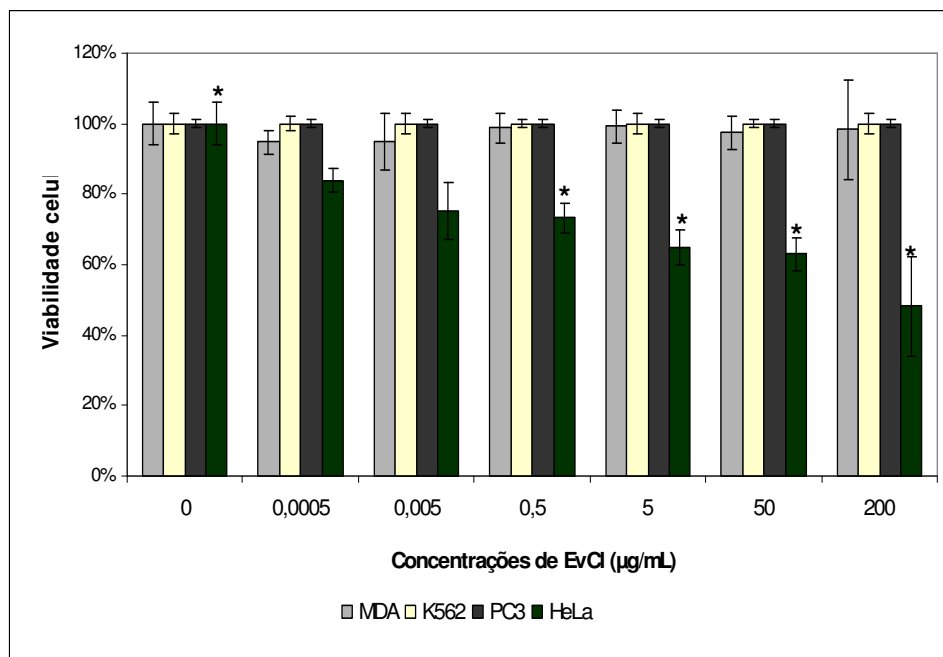


Figura 18. Citotoxicidade do EvCl em células HeLa e MDA avaliada pelo teste de redução de MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações de EvCl (0,0005–200 µg/mL) por 72 h em microplacas de cultura. A viabilidade das células tratadas com EvCl foi expressa como porcentagem da viabilidade das células controle não tratadas. Os resultados foram representados como média \pm DP da triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle (Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns).

4.3.12 Efeitos do inibidor sobre a indução de apoptose/necrose em células HeLa

Diante do efeito citotóxico do EvCl em células HeLa, investigou-se a possibilidade de indução de apoptose/necrose pela dupla marcação com anexina V/PI e análise por citometria de fluxo. As células foram cultivadas por 72 horas na presença de 0,005 µg/mL e 50 µg/mL inibidor. A Figura 19 resume os dados obtidos.

Os dados mostraram uma pequena, mas significativa, diferença nas porcentagens de células em apoptose (An^+PI^-) e necrose/apoptose tardia (An^+PI^+) quando submetidas ao tratamento com 50 µg/mL de EvCl. No entanto este efeito não foi comparável aos resultados obtidos no ensaio de viabilidade pela redução do MTT. Indicando que o inibidor não é citotóxico

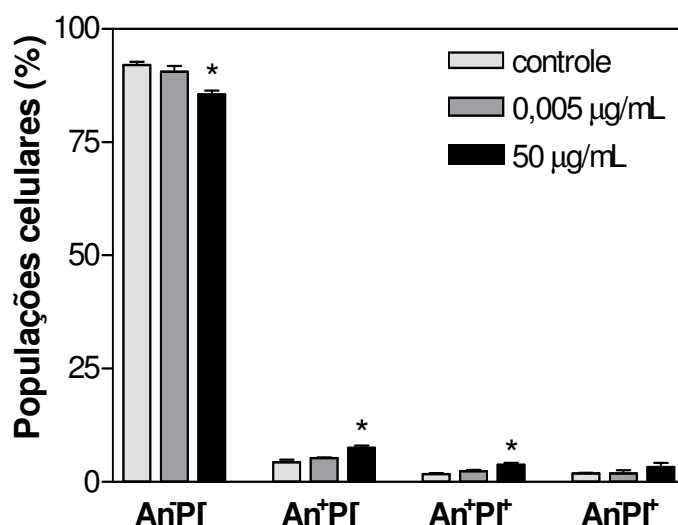


Figura 19. Avaliação da morte celular após exposição de células HeLa a 0,005 e 50 µg/mL de inibidor por 72 h. As populações com marcação positiva para anexina V-FITC (An⁺), iodeto de propídeo (PI⁺) e dupla marcação (An⁺PI⁺) foram analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos/amostra). Os resultados foram representados como média ± DP da duplicata. *p<0,05 em relação ao controle (ANOVA; teste de Tukey).

4.3.13 Efeitos do inibidor sobre o ciclo celular em células HeLa

Com o intuito de verificar alterações na distribuição das células HeLa nas diferentes fases do ciclo celular. As células foram, sincronizadas e incubadas com EvCl a seguir por 72 horas. Após este período, o DNA celular foi marcado com PI e a porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular analisadas em citômetro de fluxo.

Nas culturas de células HeLa tratadas com 50 µg/mL do inibidor por 72 h observou-se redução significativa ($p<0,05$) das células na fase G0/G1, acompanhada de aumento significativo da população em S/G2/M ($p<0,05$) (Figura 20). Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada em sub-G1 após tratamento das células com o inibidor (Figura 20), confirmando os resultados obtidos na análise de indução de morte celular por citometria de fluxo após dupla marcação com anexina V/PI. Ademais, a exposição das células a uma concentração de inibidor 4 vezes superior (200 µg/mL) não provocou redução significativa na proliferação celular, avaliada pelo ensaio de redução do MTT, comparada ao tratamento com 50 µg/mL pelo mesmo período, sugerindo uma modesta atividade antiproliferativa nestas células, ainda que significativa. Em conjunto, estes resultados indicam que o

principal efeito do inibidor é a indução de parada do ciclo celular, sendo, portanto, citostático.

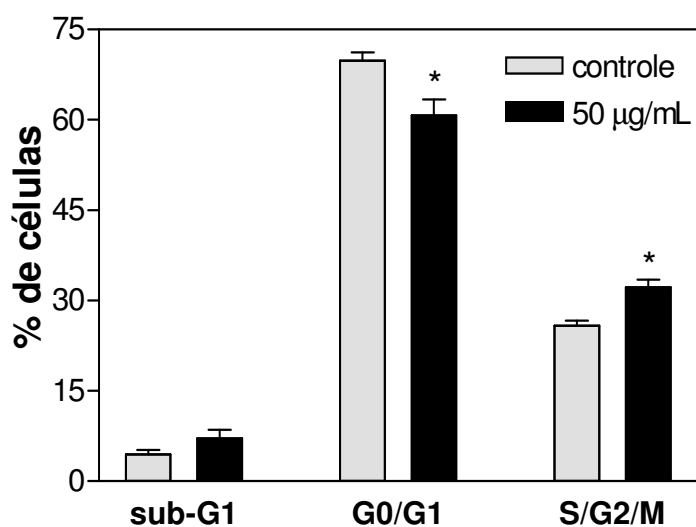


Figura 20. Populações de células HeLa nas diferentes fases do ciclo celular após 72 h de tratamento com 50 µg/mL de inibidor. Após o tratamento, as células foram marcadas com PI e analisadas em citômetro de fluxo (10.000 eventos/amostra). Os resultados foram expressos em porcentagem e representam a média \pm DP da duplicata. * $p < 0,05$ (teste *t*-Student).

5 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura vários inibidores de leguminosas do gênero *Erythrina* já foram purificados. Dentre eles, quatro inibidores de *Erythrina caffra*, sendo um específico para tripsina, um específico para quimotripsina e dois que inibem tanto tripsina como quimotripsina (Joubert, 1982a). Nas espécies *Erythrina acanthocarpa* e *Erythrina latissima* foram purificados dois inibidores de cada uma, um específico para tripsina e outro específico para quimotripsina (Joubert, 1982b; Joubert; Carlsson; Haylett, 1981).

No presente trabalho, o inibidor de quimotripsina de *Erythrina velutina* denominado EvCI, foi purificado a partir extratos totais de sementes, precipitação com sulfato de amônio, (F30-60%) e cromatografias de afinidade e fase reversa em coluna C18 (sistema FPLC/AKTA). Estas técnicas são amplamente utilizadas no processo de purificação de inibidores (Richardson, 1991). Por exemplo, inibidor de tripsina e quimotripsina de *Caesalpinia bonduc* (Bhattacharyya; Babu, 2009) e *Solanum tuberosum* (Kim *et al.*, 2005), inibidor tipo Kunitz de *Archidendron ellipticum* (Bhattacharyya *et al.*, 2006), *Tamarindus indica* (Araujo *et al.*, 2005) *Crotalaria pallida* (Gomes *et al.*, 2005) e *Entada scandens* (Lingaraju; Gowda, 2008). A recuperação no último passo foi de 0, 002% (Tabela 3), resultado esse inferior aos encontrados para outros inibidores tipo Kunitz (Bhattacharyya, *et al.*, 2006; Bhattacharyya; Rai; Babu, 2007; Gomes, *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2001). Já a purificação foi de 365 vezes, valor superior ao encontrado por (Gomes, *et al.*, 2005) para o inibidor de tripsina de sementes de *C. pallida*, purificado 180 vezes. O inibidor de tripsina de sementes de *A. ellipticum*, AeTI foi purificado 124 vezes (Bhattacharyya, *et al.*, 2006). Portanto a pureza de EvCI é maior do que a de outros inibidores similares da literatura.

As sequências dos peptídeos oriundos da digestão enzimática de EvCI analisadas por espectrometria de massas apresentaram 100% de identidade com a sequência de ECI inibidor de quimotripsina de *Erythrina variegata* (Iwanaga; Yamasaki; Kimura, 1998). A análise eletroforética do EvCI revelou a presença de uma única banda protéica, com massa molecular (MM) aparente em torno de 17 kDa e pela eletroforese bidimensional e espectrometria de massas MALDI-TOF-MS quatro isoformas com massa molecular de 17 kDa. Isto está de acordo com as massas moleculares determinadas para os seguintes inibidores de quimotripsina já

purificados: *Lens culinaris* 16 kDa (Cheung; Ng, 2007), *Schizolobium parahyba* 20 kDa, (Teles *et al.*, 2004) e *Psophocarpus tetragonolobus*, 21 kDa (Kortt, 1980). Dos mais estudados, apenas os inibidores de quimotripsina de *Oesophagostomum radiatum* 32 kDa (Willadsen, 1977), *Erythrina variegata* 40 kDa (Iwanaga; Yamasaki; Kimura, 1998), *Acacia confusa* 70 kDa (Lam; Ng) e o inibidor de tripsina-quimotripsina de *Acacia confusa* 42 kDa (Lin *et al.*, 1991), têm massas moleculares superiores a 25 kDa.

De acordo com a focalização isoelétrica, EvCI possui quatro isoformas, todas com *pI*s ácidos de 5,06; 4,83; 4,63; 4,42. A natureza ácida e a presença de iso-inibidores são características comuns em inibidores tipo Kunitz (Bhattacharyya; Babu, 2009; Bhattacharyya, *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2000). Não está definido o papel fisiológico das isoformas, mas elas devem potencializar a defesa das plantas (Bhattacharyya, *et al.*, 2006). Alguns outros inibidores purificados que também apresentam isoformas e possuem *pI* ácidos são os inibidores de tripsina das sementes de *Archidendron ellipticum*, de *Dimorphandra mollis*, (Bhattacharyya, *et al.*, 2006; Macedo, *et al.*, 2000) e *Derris trifoliata* Lour (Bhattacharyya; Babu, 2009). Em contraste, o inibidor de quimotripsina de sementes de *Schizolobium parayba*, apresenta *pI* ácido e não possui isoformas (Souza *et al.*, 1995).

Em relação à especificidade, EvCI inibe a quimotripsina com um IC_{50} de $1,3 \times 10^{-7}$ M, não afetando porém a atividade da tripsina e da elastase pancreática, e inibe apenas moderadamente a atividade da elastase neutrofílica. Inibidores que possuem atividade anti-quimotriptica, mas não afetam a atividade da tripsina já foram purificados de sementes de outras espécies do gênero *Erythrina* (Joubert, 1982a; Joubert, 1982b; Joubert; Carlsson; Haylett, 1981), de *Acacia confusa* (Lam; Ng), *Schizolobium parayba* (Souza, *et al.*, 1995) e *Psophocarpus tetragonolobus* (Kortt, 1980). Os inibidores isolados de *Derris trifoliata* Lour (Bhattacharyya; Babu, 2009), *Caesalpinia bonduc* (Bhattacharyya; Rai; Babu, 2007), *Archidendron ellipticum* (Bhattacharyya, *et al.*, 2006) e *Acacia confusa* (Lin *et al.*, 1991) são inibidores que têm a capacidade de inibir tanto tripsina como quimotripsina.

EvCI também não possui atividade inibitória sobre a protease cisteínica papaína; portanto, ele não apresenta a característica da bifuncionalidade que está presente em alguns inibidores de proteases serínicas, como o inibidor isolado de *Crotalaria pallida* (Gomes, *et al.*, 2005) e os inibidores isolados de *Pithecellobium dumosum*, PdKI, PdKI-2 (Oliveira *et al.*, 2007a; Oliveira *et al.*, 2007b). Portanto EvCI

é um inibidor específico para quimotripsina, indicando que esse inibidor pode desempenhar um importante papel na cura e/ou prevenção de diversas doenças. (Champ, 2002; Duranti, 2006; Scarafoni, *et al.*, 2008).

Os experimentos de cinética indicam que EvCI inibe a quimotripsina de modo competitivo. Resultados semelhantes são encontrados para os inibidores isolados de *Archidendron ellipticum* (Bhattacharyya, *et al.*, 2006), *Derris trifoliata* Lour (Bhattacharyya; Babu, 2009), que inibem a quimotripsina de forma competitiva e para os inibidores de tripsina PdKI de *Pithecellobium dumosum* e o inibidor isolado de semente de *Piptadenia moniliformis*, que também apresentam esse mecanismo de inibição (Cruz, 2008; Oliveira, *et al.*, 2007b). Por outro lado, os inibidores de quimotripsina e de tripsina-quimotripsina de *Acacia confusa* (Lam; Ng 2009; Lin *et al.*, 1991) que apresentam um mecanismo não-competitivo. EvCI forma um complexo com a quimotripsina do tipo 1:1. Essa estequiometria é a mesma do inibidor purificado de *Schizolobium parayba* (Souza, *et al.*, 1995) e do *Derris trifoliata* Lour (Bhattacharyya; Babu, 2009). Já o inibidor de *Psophocarpus tetragonolobus* apresenta uma relação estequiométrica de 1:2 com a quimotripsina (Kortt, 1980). Enquanto que o inibidor de quimotripsina e de tripsina-quimotripsina de *Acacia confusa* (Lam; Ng, 2009; Lin *et al.*, 1991) possuem uma relação estequiométrica com a quimotripsina de 2:1, provavelmente devido à sua estrutura dimérica. O que difere do inibidor AeTI de sementes de *Archidendron ellipticum* que possui uma relação molar menor do que 1 com a quimotripsina (Bhattacharyya, *et al.*, 2006)

O valor da constante de inibição (K_i) calculado para EvCI foi de 4×10^{-8} M. Outros inibidores que inibem quimotripsina, mas são específicos para esta enzima, como o inibidor de *Derris trifoliata* Lour, *Plathymenia foliosa* e o inibidor de *Caliandra selloi*, possuem K_i de $1,25 \times 10^{-10}$ M, $1,4 \times 10^{-6}$ M e $4,95 \times 10^{-7}$ M respectivamente (Bhattacharyya; Babu, 2009; Ramos Vda *et al.*, 2008). O K_i encontrado para EvCI é inferior ao encontrado para o inibidor específico de quimotripsina SPCI, que cujo valor é de $5,85 \times 10^{-8}$ M (Souza, *et al.*, 1995), mostrando que a afinidade de EvCI pela quimotripsina é maior do que a afinidade deste inibidor por essa enzima.

Os inibidores possuem como uma de suas características a alta estabilidade funcional (Mello, *et al.*, 2001). Deste modo, eles conservam grande parte da atividade inibitória mesmo na presença de agentes desnaturantes, tanto físicos (temperatura e pH), como químicos (DTT). EvCI não apresentou redução da

atividade inibitória quando exposto a temperatura de 100 °C por 30 minutos, demonstrando assim ser altamente termoestável. Essa alta estabilidade térmica é encontrada também no inibidor de *Poecilanthe parviflora*, que mantém sua atividade após ser exposto a 100 °C (Garcia *et al.*, 2004). No entanto, a estabilidade térmica de EvCI é maior do que a encontrada em muitos outros inibidores purificados (Gomes, *et al.*, 2005; Macedo, *et al.*, 2007; Souza, *et al.*, 1995).

A atividade inibitória de EvCI também não foi influenciada pelo pH. Não houve decréscimo da atividade inibitória de EvCI quando ele foi exposto a uma faixa de pH de 2 – 12. Resultados similares foram encontrados para outros inibidores Kunitz tais como, ILTI de *Inga laurina*, CpaTI de *Crotalaria pallida*, SPCI de *Schizolobium Parayba*, PDTI de *Pithecellobium dulce*, DMTI-II de *Dimorphandra mollis* e PDKI – 2 de *Pithecellobium dumosum* (Gomes, *et al.*, 2005; Macedo, *et al.*, 2007; Oliveira, *et al.*, 2007a; Souza, *et al.*, 1995)). Esta estabilidade é provavelmente devido ao fato do inibidor apresentar uma baixa massa molecular.

EvCI também foi resistente à ação do agente redutor DTT. A atividade inibitória foi alterada apenas quando EvCI permaneceu por 2 horas em solução de DTT na concentração de 100 mM, na qual houve uma redução de 50% do percentual de inibição. Resultado semelhante é encontrado para o inibidor de *Inga laurina*, ILTI, que perde 56% da atividade inibitória quando exposto a 100 mM de DTT por 2 horas (Macedo, *et al.*, 2007). No entanto, essa alta estabilidade ao DTT é superior à encontrada em outros inibidores de sementes de *Derris trifoliata* Lour. *Entada scandens*, *Poecilanthe parviflora* e *Pithecellobium dulce* (Bhattacharyya; Babu, 2009; Garcia, *et al.*, 2004)). Normalmente, a alta estabilidade dos inibidores aos agentes desnaturantes é atribuída à presença de pontes dissulfeto intramoleculares (Garcia, *et al.*, 2004; Macedo, *et al.*, 2007). Entretanto, a estabilidade de EvCI pode não estar relacionada apenas com pontes dissulfeto, já que o agente redutor DTT apesar de desfazer as pontes dissulfeto, não diminui a atividade inibitória de EvCI ou as pontes dissulfeto intramoleculares do EvCI estão distantes do sítio reativo, determinando a estabilidade funcional do mesmo. Resultado semelhante a esse foi encontrado para o inibidor de tripsina de *E. caffra*, ETI, cujas pontes dissulfeto também não estavam relacionadas com sua funcionalidade (Lehle; Wrba; Jaenicke, 1994).

Diversos compostos purificados de plantas também estão sendo avaliados quanto as suas aplicações bioquímicas e terapêuticas. Assim, o potencial citotóxico

foi do EvCI foi analisado em diferentes linhagens de células tumorais: HeLa, HepG2, MDA, PC3 e K562. O EvCI inibiu a proliferação celular de células HeLa com um IC₅₀ de 50 µg/mL; no entanto, não apresentou efeito tóxico em outras linhagens de células tumorais (K562, PC3 e HepG2). O EvCI mostrou uma atividade antitumoral específica, o que é similar a outros inibidores de protease já analisados, por exemplo, inibidor de quimotripsina de *Acacia confusa* 9 (Lam; Ng)

O EvCI reduziu a viabilidade celular analisada pela metabolização de MTT e induziu alterações no ciclo celular. Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada em sub-G1 após tratamento das células com o inibidor, confirmando os resultados obtidos na análise de indução de morte celular. A análise por citometria de fluxo após dupla marcação com anexina V/PI mostrou uma redução significativa ($p < 0,05$) das células na fase G0/G1 e o aumento na proporção de células nas fases S e G2/M ($p < 0,05$) do ciclo celular, sugerindo assim um efeito citostático em células HeLa (Figura 20). Da mesma forma que IPBBIs que apresentaram efeito citostático no ciclo celular de células de osteosarcoma (Saito *et al.*, 2007). Outro exemplo é o inibidor BBI clássico que teve um efeito significativo na redução da proliferação de células MCF-7 (Chen, *et al.*, 2005). Efeitos citostáticos de inibidores de IPBBIs em células tumorais cultivadas *in vitro* já foram descritos na literatura. Tais efeitos foram observados em células de câncer de próstata (Kennedy; Wan, 2002; Wan *et al.*, 1998), ovário (Wan, *et al.*, 1998), mama (Zhang, *et al.*, 1999), colon (Clemente *et al.*, 2005), osteosarcoma (Saito, *et al.*, 2007), boca (Zhang, *et al.*, 1999) e outros (Kennedy, 1998b).

Células tumorais apresentam diversas alterações na regulação do ciclo celular. Alterações em vias de transdução de sinal, importantes na regulação do ciclo celular e da sobrevivência da célula, são obrigatórias para o estabelecimento de todos os tipos tumoral. (Evan; Vousden, 2001). O controle da proliferação celular em células tumorais é considerado uma eficiente estratégia para prevenir ou retardar o crescimento tumoral (Molinari, 2000).

No presente trabalho, observou-se um efeito citostático de EvCI em células HeLa, apontando este inibidor como possível agente terapêutico alternativo ou complementar aos tratamentos convencionais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia as quais, apresentam eficiência moderada e efeitos colaterais.

6 CONCLUSÕES

Um inibidor de quimotripsina foi purificado de sementes de *Erythrina velutina*. EvCI tem massa molecular de 17 kDa, apresenta isoformas com pls ácidos, sequência de peptídeos tripticos com 100% de identidade com inibidor de quimotripsina de *Erythrina variegata*, inibe a quimotripsina de modo competitivo e com um K_i da ordem de 10^{-8} M, indicando que EvCI pertence a família Kunitz.

O EvCI apresenta alta estabilidade a variações de temperatura, pH e ao agente redutor DTT.

EvCI apresentou um efeito antiproliferativo seletivo para linhagens de células HeLa, com um IC_{50} de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos na avaliação da viabilidade celular e dos efeitos sobre o ciclo celular indicam que o principal efeito do inibidor é a indução de parada do ciclo celular, sendo, portanto, citostático. Estes dados sugerem que o EvCI pode ser um composto promissor para ser estudado como potencial agente anticarcinogênico no futuro.

7 REFERÊNCIAS

- ARAUJO, C. L.; BEZERRA, I. W.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, F. T.; MACEDO, L. L.; GOMES, C. E.; BARBOSA, A. E.; MACEDO, F. P.; SOUZA, T. M.; FRANCO, O. L.; BLOCH, J. C.; SALES, M. P. In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitis capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. **J Agric Food Chem.** v. 53, n. 11, p. 4381-4387, 2005.
- ARAÚJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; DANTAS, I. C.; LIMA, T. V. S.; OLIVEIRA, A. S.; MIRANDA, M. R. A.; LEITE, E. L.; SALES, M. P. Biological activity of proteins from pupls of tropical fruits. **Food Chemistry.** v. 5, n., p. 107-110, 2004.
- AZARKAN, M.; DIBIANI, R.; GOORMAGHTIGH, E.; RAUSSENS, V.; BAEYENS-VOLANT, D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable beta-sheet glycoprotein. **Biochim Biophys Acta.** v. 1764, n. 6, p. 1063-1072, 2006.
- BAUDYS, M.; GHOSH, M.; HARLOS, K.; MARES, M.; FUSEK, M.; KOSTKA, V.; BLAKE, C. C. Crystallization and preliminary crystallographic study of cathepsin D inhibitor from potatoes. **J Mol Biol.** v. 218, n. 1, p. 21-22, 1991.
- BHATTACHARYYA, A.; BABU, C. R. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: insight into structural and antimalarial features. **Phytochemistry.** v. 70, n. 6, p. 703-712, 2009.
- BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; LEIGHTON, S. M.; BABU, C. R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry.** v. 67, n. 3, p. 232-241, 2006.
- BHATTACHARYYA, A.; RAI, S.; BABU, C. R. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: isolation, partial characterization and insecticidal properties. **Plant Physiol Biochem.** v. 45, n. 3-4, p. 169-177, 2007.
- BILLINGS, P. C.; CAREW, J. A.; KELLER-MCGANDY, C. E.; GOLDBERG, A. L.; KENNEDY, A. R. A serine protease activity in C3H/10T1/2 cells that is inhibited by anticarcinogenic protease inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 84, n. 14, p. 4801-4805, 1987.
- BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **Int J Pept Protein Res.** v. 25, n. 2, p. 113-131, 1985.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **Eur J Biochem.** v. 204, n. 2, p. 433-451, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, n., p. 248-254, 1976.

BRZIN, J.; KIDRIC, M. Proteases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnology and Genetic engineering Reviews**. v. 13, n., p. 421-467, 1995.

CAVALCANTI, S. M.; DEUS, F. C.; ZARDO, L. G.; FRUGULHETTI, I. C.; OLIVEIRA, L. H. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil: a retrospective study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 91, n. 4, p. 433-440, 1996.

CHAMP, M. M. Non-nutrient bioactive substances of pulses. **Br J Nutr**. v. 88 Suppl 3, n., p. S307-319, 2002.

CHAUDHARY, N. S.; SHEE, C.; ISLAM, A.; AHMAD, F.; YERNOOL, D.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. **Phytochemistry**. v. 69, n. 11, p. 2120-2126, 2008.

CHEN, Y. W.; HUANG, S. C.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. **Carcinogenesis**. v. 26, n. 7, p. 1296-1306, 2005.

CHEUNG, A. H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a trypsin-chymotrypsin inhibitor from the seeds of green lentil (*Lens culinaris*). **Protein Pept Lett**. v. 14, n. 9, p. 859-864, 2007.

CLARK, D. A.; DAY, R.; SEIDAH, N.; MOODY, T. W.; CUTTITTA, F.; DAVIS, T. P. Protease inhibitors suppress in vitro growth of human small cell lung cancer. **Peptides**. v. 14, n. 5, p. 1021-1028, 1993.

CLEMENTE, A.; GEE, J. M.; JOHNSON, I. T.; MACKENZIE, D. A.; DOMONEY, C. Pea (*Pisum sativum* L.) protease inhibitors from the Bowman-Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells in vitro. **J Agric Food Chem**. v. 53, n. 23, p. 8979-8986, 2005.

CORREA, P. Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. **Cancer Res**. v. 41, n. 9 Pt 2, p. 3685-3690, 1981.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. E.; DE MORAES, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **J Ethnopharmacol**. v. 99, n. 1, p. 21-30, 2005.

CRUZ, A. C. B. Purificação, caracterização e análise da atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina em sementes de catanduva (*Piptadenia maniliformis*). Dissertação de Mestrado, UFRN, Natal, 2008.

DITTMANN, K. H.; MAYER, C.; RODEMANN, H. P. Radioprotection of normal tissue to improve radiotherapy: the effect of the Bowman Birk protease inhibitor. **Curr Med Chem Anticancer Agents**. v. 3, n. 5, p. 360-363, 2003.

DIXON, M.; WEBBER, E. C.; THERONE, C. J. R.; TRIPTON, K. F., Inhibition and Activation. In: PRESS, A. **Enzymes**. New York, 1979. p. 332-381.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**. v. 77, n. 2, p. 67-82, 2006.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch Biochem Biophys**. v. 95, n., p. 271-278, 1961.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**. v. 411, n. 6835, p. 342-348, 2001.

FALLOWFIELD, L.; CELLA, D.; CUZICK, J.; FRANCIS, S.; LOCKER, G.; HOWELL, A. Quality of life of postmenopausal women in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Adjuvant Breast Cancer Trial. **J Clin Oncol**. v. 22, n. 21, p. 4261-4271, 2004.

FAN, S. G.; WU, G. J. Characteristics of plant protease inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Bot. Bull. Acad. Sin.** v. 46, n., p. 273-292, 2005.

FERREIRA, C. V.; JUSTO, G. Z.; SOUZA, A. C.; QUEIROZ, K. C.; ZAMBUZZI, W. F.; AOYAMA, H.; PEPPELENBOSCH, M. P. Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives. **Biochimie**. v. 88, n. 12, p. 1859-1873, 2006.

FOOK, J. M.; MACEDO, L. L.; MOURA, G. E.; TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, A. S.; QUEIROZ, A. F.; SALES, M. P. A serine proteinase inhibitor isolated from *Tamarindus indica* seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. **Life Sci**. v. 76, n. 25, p. 2881-2891, 2005.

FORSTER, C.; NORTH, H.; AFZAL, N.; DOMONEY, C.; HORNOSTAJ, A.; ROBINSON, D. S.; CASEY, R. Molecular analysis of a null mutant for pea (*Pisum sativum* L.) seed lipoxygenase-2. **Plant Mol Biol**. v. 39, n. 6, p. 1209-1220, 1999.

FRENKEL, K.; CHRZAN, K.; RYAN, C. A.; WIESNER, R.; TROLL, W. Chymotrypsin-specific protease inhibitors decrease H₂O₂ formation by activated human polymorphonuclear leukocytes. **Carcinogenesis**. v. 8, n. 9, p. 1207-1212, 1987.

FRIEDMAN, D. B.; HOVING, S.; WESTERMEIER, R. Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzymol**. v. 463, n., p. 515-540, 2009.

GARCIA, V. A.; FREIRE, M. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. **Protein J**. v. 23, n. 5, p. 343-350, 2004.

GOMES, C. E.; BARBOSA, A. E.; MACEDO, L. L.; PITANGA, J. C.; MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F.; MACEDO, F. P.;

- ANDRADE, L. B.; VIDAL, M. S.; SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiol Biochem.** v. 43, n. 12, p. 1095-1102, 2005.
- GORG, A.; BOGUTH, G.; OBERMAIER, C.; WEISS, W. Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. **Electrophoresis.** v. 19, n. 8-9, p. 1516-1519, 1998.
- HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology, Review.** v. 2, n. 3, p. 68-85, 2007.
- HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Biochemical characterization, stability studies and N-terminal sequence of a bi-functional inhibitor from *Phaseolus aureus* Roxb. (Mung bean). **Biochimie.** v. 87, n. 12, p. 1127-1136, 2005.
- ISHIHARA, M.; SHIROMA, T.; TAIRA, T.; TAWATA, S. Purification and characterization of extracellular cysteine protease inhibitor, ECPI-2, from *Chlorella* sp. **J Biosci Bioeng.** v. 101, n. 2, p. 166-171, 2006.
- IWANAGA, S.; YAMASAKI, N.; KIMURA, M. Chymotrypsin inhibitor from *Erythrina variegata* seeds: involvement of amino acid residues within the primary binding loop in potent inhibitory activity toward chymotrypsin. **J Biochem.** v. 124, n. 3, p. 663-669, 1998.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J Clin.** v. 58, n. 2, p. 71-96, 2008.
- JOUBERT, F. J. Purification and properties of the proteinase inhibitors from *Erythrina caffra* (coast *Erythrina*) seed. **Int J Biochem.** v. 14, n. 3, p. 187-193, 1982a.
- JOUBERT, F. J. Purification and some properties of two proteinase inhibitors from *Erythrina acanthocarpa* seed. **J Nat Prod.** v. 45, n. 4, p. 427-433, 1982b.
- JOUBERT, F. J.; CARLSSON, F. H.; HAYLETT, T. Purification and some properties of two proteinase inhibitors (DE-1 and DE-3) from *Erythrina latissima* (broad-leaved *erythrina*) seed. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem.** v. 362, n. 5, p. 531-538, 1981.
- KATUNUMA, N.; OHASHI, A.; SANO, E.; MURATA, E.; SHIOTA, H.; YAMAMOTO, K.; MAJIMA, E.; LE, Q. T. New cysteine protease inhibitors in physiological secretory fluids and their medical significance. **Adv Enzyme Regul.** v. 43, n., p. 393-410, 2003.
- KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J. A.; ALI, I.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **J Nutr.** v. 130, n. 2S Suppl, p. 467S-471S, 2000.

KENNEDY, Overview: anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In: **Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents**. Plenum Press: New York, 1993. p. 9-64.

KENNEDY, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **Am J Clin Nutr.** v. 68, n. 6 Suppl, p. 1406S-1412S, 1998a.

KENNEDY, A. R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacol Ther.** v. 78, n. 3, p. 167-209, 1998b.

KENNEDY, A. R.; WAN, X. S. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. **Prostate.** v. 50, n. 2, p. 125-133, 2002.

KENNEDY AR. NEW YORK: PLENUM PRESS, Overview: anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In: **Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents**. Plenum Press: New York, 1993. p. 9-64.

KIM, J. Y.; PARK, S. C.; KIM, M. H.; LIM, H. T.; PARK, Y.; HAHM, K. S. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 330, n. 3, p. 921-927, 2005.

KOIWA, H.; SUBRAMANIAN, L.; SHADE, R. E.; ZHU, K. Y.; NIELSEN, S. S.; MURDOCK, L. L.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Insecticidal activities of soybean cysteine protease inhibitors are correlated with their papain-binding affinities as phage-displayed proteins. **Plant Physiology.** v. 114, n., p. 1115-1120, 1997.

KORTT, A. A. Isolation and properties of a chymotrypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) Dc.). **Biochim Biophys Acta.** v. 624, n. 1, p. 237-248, 1980.

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

LAM, S. K.; NG, T. B. A dimeric high-molecular-weight chymotrypsin inhibitor with antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from seeds of *Acacia confusa*. **Phytomedicine.** v. 17, n. 8-9, p. 621-625,

LASKOWSKI JR.; M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu. Rev. Biochem.** v. 49, n., p. 593-626, 1980.

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

LEHLE, K.; WRBA, A.; JAENICKE, R. Erythrina caffra trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. **J Mol Biol.** v. 239, n. 2, p. 276-284, 1994.

LIN, J. Y.; CHU, S. C.; WU, H. C.; HSIEH, Y. S. Trypsin inhibitor from the seeds of Acacia confusa. **J Biochem.** v. 110, n. 6, p. 879-883, 1991.

LINGARAJU, M. H.; GOWDA, L. R. A Kunitz trypsin inhibitor of Entada scandens seeds: another member with single disulfide bridge. **Biochim Biophys Acta.** v. 1784, n. 5, p. 850-855, 2008.

MACEDO, M. L.; DE MATOS, D. G.; MACHADO, O. L.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Trypsin inhibitor from Dimorphandra mollis seeds: purification and properties. **Phytochemistry.** v. 54, n. 6, p. 553-558, 2000.

MACEDO, M. L.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. G.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of Inga laurina (SW.) Willd. **Phytochemistry.** v. 68, n. 8, p. 1104-1111, 2007.

MAGNI, C.; SCARAFONI, A.; HERNDL, A.; SESSA, F.; PRINSI, B.; ESPEN, L.; DURANTI, M. Combined 2D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome. **Phytochemistry.** v. 68, n. 7, p. 997-1007, 2007.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat Rev Cancer.** v. 2, n. 2, p. 143-148, 2002.

MELLO, G. C.; OLIVA, M. L.; SUMIKAWA, J. T.; MACHADO, O. L.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from Dimorphandra mollis seeds. **J Protein Chem.** v. 20, n. 8, p. 625-632, 2001.

MESSADI, D. V.; BILLINGS, P.; SHKLAR, G.; KENNEDY, A. R. Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor. **J Natl Cancer Inst.** v. 76, n. 3, p. 447-452, 1986.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Prolif.** v. 33, n. 5, p. 261-274, 2000.

MORTIMER, J. E.; BOUCHER, L.; BATY, J.; KNAPP, D. L.; RYAN, E.; ROWLAND, J. H. Effect of tamoxifen on sexual functioning in patients with breast cancer. **J Clin Oncol.** v. 17, n. 5, p. 1488-1492, 1999.

MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med.** v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

- NEURATH, H., The diversity of proteolytic enzymes. In: **Proteolytic Enzymes: A Practical approach**. Oxford University Press: New York, 1996. p. 1-14.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**. v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**. v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- ODANI, S.; YOKOKAWA, Y.; TAKEDA, H.; ABE, S.; ODANI, S. The primary structure and characterization of carbohydrate chains of the extracellular glycoprotein proteinase inhibitor from latex of *Carica papaya*. **Eur J Biochem**. v. 241, n. 1, p. 77-82, 1996.
- OLIVA, M. L.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F.; ARAUJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochim Biophys Acta**. v. 1477, n. 1-2, p. 64-74, 2000.
- OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K.; MACEDO, L. L.; ANDRADE, L. B.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; DE SALES, M. P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiol Biochem**. v. 45, n. 10-11, p. 858-865, 2007a.
- OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K.; MACEDO, L. L.; ANDRADE, L. B.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; SALES, M. P. Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. **J Agric Food Chem**. v. 55, n. 18, p. 7342-7349, 2007b.
- OLIVEIRA, C. M. Isolamento e caracterização parcial de inibidores de tripsina e quimotripsina de tubérculos de *Colocasia esculenta*. Dissertação de Mestrado, UFRN, Natal, 2001.
- PAES, N. S.; GERHARDT, I. R.; COUTINHO, M. V.; YOKOYAMA, M.; SANTANA, E.; HARRIS, N.; CHRISPEELS, M. J.; GROSSI DE SA, M. F. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. **J Insect Physiol**. v. 46, n. 4, p. 393-402, 2000.
- PARK, K. S.; CHEONG, J. J.; LEE, S. J.; SUH, M. C.; CHOI, D. A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by tobacco mosaic virus infection. **Biochim Biophys Acta**. v. 1492, n. 2-3, p. 509-512, 2000.
- PISANI, P.; PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J. Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 83, 18-29 (1999). **Int J Cancer**. v. 83, n. 6, p. 870-873, 1999.

PRAKASH, B.; SELVARAJ, S.; MURTHY, M. R.; SREERAMA, Y. N.; RAO, D. R.; GOWDA, L. R. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. **J Mol Evol.** v. 42, n. 5, p. 560-569, 1996.

QI, R. F.; SONG, Z. W.; CHI, C. W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).** v. 37, n. 5, p. 283-292, 2005.

RAMOS VDA, S.; SILVA GDE, S.; FREIRE, M. G.; MACHADO, O. L.; PARRA, J. R.; MACEDO, M. L. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. **J Agric Food Chem.** v. 56, n. 23, p. 11348-11355, 2008.

RAO, K. N.; HEGDE, S. S.; LEWIS, R. J.; SURESH, C. G. Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of a Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** v. 55, n. Pt 11, p. 1920-1922, 1999.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon.** v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

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

RICHARDSON, M., Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: **Methods in plants Biochemistry.** Academic Press: New York, 1991. p. 259-305.

RITONJA, A.; KRIZAJ, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKELJ, B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J.; TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Lett.** v. 267, n. 1, p. 13-15, 1990.

RYAN, C. A. Protease inhibitor in plants: Genes for Improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology.** v. 28, n., p. 425-449, 1990.

SAITO, T.; SATO, H.; VIRGONA, N.; HAGIWARA, H.; KASHIWAGI, K.; SUZUKI, K.; ASANO, R.; YANO, T. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. **Cancer Lett.** v. 253, n. 2, p. 249-257, 2007.

SANO, J.; OHKI, K.; HIGUCHI, T.; AIHARA, K.; MIZUNO, S.; KAJIMOTO, O.; NAKAGAWA, S.; KAJIMOTO, Y.; NAKAMURA, Y. Effect of casein hydrolysate, prepared with protease derived from *Aspergillus oryzae*, on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. **J Med Food.** v. 8, n. 4, p. 423-430, 2005.

SAWEY, M. J.; HOOD, A. T.; BURNS, F. J.; GARTE, S. J. Activation of c-myc and c-K-ras oncogenes in primary rat tumors induced by ionizing radiation. **Mol Cell Biol.** v. 7, n. 2, p. 932-935, 1987.

SCARAFONI, A.; CONSONNI, A.; GALBUSERA, V.; NEGRI, A.; TEDESCHI, G.; RASMUSSEN, P.; MAGNI, C.; DURANTI, M. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. **Phytochemistry**. v. 69, n. 9, p. 1820-1825, 2008.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**. v. 11, n. 3, p. 431-444, 1999.

SOUZA, E. M.; MIZUTA, K.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**. v. 39, n. 3, p. 521-525, 1995.

STOREY, R. D.; WAGNER, F. W. Plant proteases: a need for uniformity. **Phytochemistry**. v. 25, n., p. 2701-2709, 1986.

SUMATHI, S.; PATTABIRAMAN, T. N. Natural plant enzyme inhibitors. VI. Studies on trypsin inhibitors of *Colocasia antiquorum* tubers. **Biochim Biophys Acta**. v. 566, n. 1, p. 115-127, 1979.

TELES, R. C.; DE SOUZA, E. M.; CALDERON LDE, A.; DE FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**. v. 65, n. 7, p. 793-799, 2004.

USSUF, K. K.; LAXMI, N. H.; MITRA, R. Protease inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Current Science**. v. 80, n., p. 847-853, 2001.

VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; KLADNITSKAYA, G. V.; MOSOLOV, V. V. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora*-infected potato tubers. **FEBS Lett**. v. 426, n. 1, p. 131-134, 1998.

VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Potato tuber protein proteinase inhibitors belonging to the Kunitz soybean inhibitor family. **Biochemistry (Mosc)**. v. 62, n. 12, p. 1367-1374, 1997.

WALKER, A. J.; FORD, L.; MAJERUS, M. E. N.; GEOGHEGAN, A. E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Characterization of the Mid-gut Digestive Protease Activity of the Two-spot Ladybird (*Adalia bipunctata*) and its Sensitivity to Protease Inhibitors. **Insect Biochem. And Mol. Biol.** v. 28, n., p. 173-180, 1997.

WAN, X. S.; HAMILTON, T. C.; WARE, J. H.; DONAHUE, J. J.; KENNEDY, A. R. Growth inhibition and cytotoxicity induced by Bowman-Birk inhibitor concentrate in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. **Nutr Cancer**. v. 31, n. 1, p. 8-17, 1998.

WILLADSEN, P. A chymotrypsin inhibitor from the parastitic nematode, *Oesophagostomum radiatum*. **Aust J Biol Sci**. v. 30, n. 5, p. 411-419, 1977.

WONG, J. H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose/mannose/rhamnose-specific lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. **Arch Biochem Biophys**. v. 439, n. 1, p. 91-98, 2005.

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. **Organização dos Estados Americanos-OEA**. v., n., p. 1-31, 1993.

YE, X. Y.; NG, T. B.; RAO, P. F. A Bowman-Birk-type trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 289, n. 1, p. 91-96, 2001.

ZHANG, L.; WAN, X. S.; DONAHUE, J. J.; WARE, J. H.; KENNEDY, A. R. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on clonogenic survival and cisplatin- or radiation-induced cytotoxicity in human breast, cervical, and head and neck cancer cells. **Nutr Cancer**. v. 33, n. 2, p. 165-173, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)