



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Purificação Preparativa de Inibidores Bowman-Birk,
Quantificação em Alimentos e Características Imunogênicas
dos Inibidores da *Glycine max* e da *Macrotyloma axillare***

AUTORA: Sonaly Cristine Leal

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade

COORIENTADOR: Prof. Dr. William de Castro Borges

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Ouro Preto - MG, junho de 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

L435p Leal, Sonaly Cristine.

Purificação preparativa de inibidores Bowman-Birk, quantificação em alimentos e características imunogênicas dos inibidores da *Glycine Max* e da *Macrotyloma Axillare* [manuscrito] / Sonaly Cristine Leal. - 2010.
xix, 84 f.: il., color.; grafs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade.
Co-orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Proteinase - Inibidores - Teses. 2. Câncer - Teses. 3. Soja - Teses.
I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 66.097.8:577.112

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Este trabalho foi realizado no LABORATÓRIO DE ENZIMOLOGIA E PROTEÔMICA - ICEB/NUPEB/UFOP, com auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Dedico esta dissertação aos meus pais que sorrindo, sofreram as minhas decepções e chorando aplaudiram todas as minhas conquistas.

*“Cada dia do homem é uma noite escura.
Ninguém sabe o que vai acontecer no
próximo minuto, e mesmo assim as pessoas
andam para frente. Porque confiam.
Porque têm fé.”*

(Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, que com a sua suprema bondade ajudou-me em mais uma conquista;

Aos **meus pais**, que mesmo diante de muitas dificuldades souberam me educar e transmitir os principais sentidos da vida. Obrigada pelo amor incondicional e exemplos de honestidade, dignidade e respeito;

Ao **Evandro**, pelo amor, carinho, companheirismo, apoio e incentivo. Obrigada por compreender as minhas ansiedades, ausências e inseguranças. Você é uma pessoa muito especial

Ao **meu irmão e família**, pelo incentivo e por compreender a minha ausência durante a realização desse trabalho;

Ao **Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade**, pela orientação, apoio e incentivo para a realização deste trabalho. Obrigada por não ter sido apenas um mestre, mas um ser humano capaz de compartilhar conhecimento, alegrias e tristezas;

Ao **Prof. Dr. William de Castro Borges** por quem tenho grande admiração e carinho. Obrigada pela co-orientação, amizade, confiança e ensinamentos;

Ao **Prof. José Armando Ansaloni e à Prof.^a Cláudia Antônia Alcântara Amaral**, pela confiança que depositaram em mim durante a minha graduação. Vocês são para mim referências de amizade e profissionalismo;

À **todos os colegas e amigos do Laboratório de Enzimologia e Proteômica**, peço licença para não nomear a cada um, mas sou profundamente agradecida a todos, pelo apoio, incentivo e respeito durante todo o período de convivência;

À **Fabiana**, pelo carinho, apoio e incentivo. Obrigada, não apenas por me auxiliar na realização desse trabalho, mas pela verdadeira amizade que surgiu no meio de tanto aprendizado;

À **Karina**, pela amizade, companheirismo e apoio, principalmente no durante o período de conclusão desse trabalho;

Ao amigo **Douglas**, pelos deliciosos cafés, conversas e desabafos. Obrigada pelo apoio e incentivo para a realização desse trabalho;

À **Karina (LBBM)**, pela verdadeira amizade demonstrada durante o curso;

Ao nosso técnico, **José Henrique Braga Fortes**, pelo carinho e disponibilidade. Obrigada por me socorrer em diversos momentos difíceis;

Aos **professores do NUPEB**, principalmente àqueles que contribuíram de maneira construtiva para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso, do Laboratório de Caracterização Molecular da UFOP, e toda a sua equipe, pela disponibilização de equipamentos e auxílio na execução e análises de alguns experimentos;

À querida Cida, secretária do NUPEB. Sua paciência, presteza e compromisso foram determinantes na concretização dessa etapa;

Enfim, agradeço a todos, que de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

Resumo	X
Abstract	XII
Lista de abreviaturas	XIV
Lista de figuras	XVII
Lista de tabelas	XIX
1. Introdução	2
1.1. Epidemiologia do câncer	2
1.2. Biologia do câncer	3
1.3. Papel das proteases no desenvolvimento do câncer	6
1.3.1. Serino-proteases	8
1.4. Inibidores de proteases	10
1.4.1. Inibidores de tripsina do tipo kunitz.....	11
1.4.2. Inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk.....	12
1.5. Propriedades funcionais e fisiológicas do BBI.....	16
1.6. Farmacocinética dos inibidores Bowman-Birk	18
1.7. Mecanismos de ação anti-tumoral dos inibidores Bowman-Birk.....	20
2. Justificativa e Objetivos	23
2.1. Justificativa	23
2.2. Objetivos gerais	24
2.3. Objetivos específicos	24
3. Materiais e métodos	26
3.1. Obtenção do extrato enriquecido de soja (BBIC) através de método tradicional	26
3.2. Métodos de obtenção do BBI das sementes de soja	26
3.2.1. Delineamento dos métodos de obtenção do BBI das sementes de soja ..	26
3.2.2. Obtenção do extrato protéico (EP).....	27
3.2.3. Teste de estabilidade térmica dos inibidores.....	27
3.2.4. Precipitação por tratamento térmico do extrato protéico	28
3.2.5. Precipitação por etanol e acetona a frio	28
3.2.6. Precipitação por etanol a frio	28
3.3. Caracterização do BBI por eletroforese em gel de poliacrilamida	29
3.4. Cromatografia de fase reversa	30
3.5. Caracterização do BBI por espectrometria de massa	31

3.6. Dosagem de proteínas.....	31
3.7. Ensaio enzimáticos.....	31
3.7.1. Atividade inibitória anti-tripsina e anti-quimotripsina bovina.....	31
3.8. Tabelas de purificação	32
3.9. Análise comparativa das seqüências de BBI extraídos de duas leguminosas	33
3.10. Obtenção de anti-soros específicos para detecção do BBI.....	33
3.11. Dot blot	34
3.12. Western blot.....	34
3.13. Quantificação de BBI em alimentos através de ensaios enzimáticos	35
3.14. Tratamento de animais com alimentos suplementados com BBI.....	36
3.15. Análise estatística	36
4. Resultados e discussão	38
4.1. Obtenção e análise do BBIC descrito na literatura.....	38
4.2. Purificação e caracterização do BBI de soja.....	39
4.2.1. Obtenção do extrato protéico	39
4.2.2. Teste de estabilidade térmica e tratamento térmico	41
4.2.3. Precipitação dos EPTT com etanol e/ou acetona	43
4.2.4. Método de obtenção de BBI de soja a partir de substâncias de origem natural.....	45
4.2.5. Análises quantitativa e qualitativa dos diferentes métodos de preparação de BBI	46
4.2.6. Identificação do BBI por Western blot	48
4.2.7. Análise da preparação de BBI através de cromatografia de fase reversa	51
4.3. Quantificação do BBI em alimentos.....	54
4.4. Consumo da ração suplementada com BBI e monitoramento do peso de camundongos tratados	57
4.5. Obtenção de anti-soros específicos para BBI.....	59
4.6. Análise comparativa da imunogenicidade dos Inibidores Bowman-Birk de <i>Glycine max</i> e <i>Macrotyloma axillare</i>	62
5. Conclusões.....	65
6. Perspectivas	67
7. Referências Bibliográficas.....	69
8. Apêndice	79

Resumo

Os inibidores do tipo Bowman-Birk, comumente chamados de BBI, são moléculas protéicas caracterizadas pela presença de dois domínios independentes, capazes de inibir serino-proteases. Embora os mecanismos de atividade biológica dessas moléculas não estejam totalmente elucidados, o interesse por essa classe de inibidores está relacionado com a descoberta de que o BBI pode atuar como agente preventivo do câncer. A capacidade do BBI de prevenir a carcinogênese tem sido estudada extensivamente, tanto em sua forma purificada quanto na forma de extrato protéico de soja enriquecido de BBI, chamado de BBI concentrado (BBIC). O emprego desses extratos enriquecidos em experimentos com animais e humanos deve-se ao elevado custo para a obtenção do BBI puro. Vários estudos demonstraram que esses extratos possuem atividade anti-carcinogênica similar ao BBI purificado. Entretanto, essa atividade, atribuída apenas ao BBI, poderia estar relacionada à presença de outros compostos quimiopreventivos nas preparações de BBIC, tais como a lunasina, isoflavonas e outros inibidores de tripsina. Desta forma, o primeiro objetivo deste trabalho baseou-se no desenvolvimento de métodos alternativos capazes de fornecer um enriquecido de BBI de soja de melhor qualidade, utilizando apenas processos típicos da indústria alimentícia. Os métodos propostos geraram preparações com elevado grau de pureza, comparado à homogeneidade das preparações de BBIC descritas anteriormente. A principal alteração do método tradicional de obtenção do BBIC consistiu na adição de EDTA ou citrato durante o tratamento térmico dos extratos protéicos. A análise das preparações por SDS-PAGE demonstrou que o BBI recuperado apresentou elevado grau de pureza. O uso de agentes quelantes provavelmente promoveu uma desestabilização das proteínas contaminantes, permitindo a remoção das mesmas por precipitação. Os inibidores Bowman-Birk, resultantes do emprego das metodologias propostas, foram identificados e caracterizados através de ensaios de atividade inibitória anti-tripsina e anti-quimotripsina, cromatografia de fase reversa e espectrometria de massa. Em paralelo, demonstramos que os anticorpos anti-BBI de *Macrotyloma axillare* foram úteis na identificação de BBIS por Western blot em nossas preparações. Essa reatividade cruzada pode ser atribuída à alta homologia estrutural compartilhada por

esses inibidores encontrados nessas leguminosas. Por outro lado, experimentos realizados com anticorpos produzidos contra BBI de soja *Glycine max* (BBIS) e peptídeo sintético, correspondente à cabeça de inibição da quimotripsina do BBI, sugeriram que ambos inibidores são menos imunogênicos que o BBI de *Macrotyloma axillare* (BBIM). O terceiro objetivo consistiu na validação de um método de quantificação de BBI ativo presente em alimentos, através de ensaios de inibição enzimática. A metodologia desenvolvida foi de simples execução e demonstrou elevada sensibilidade, sendo comparável às técnicas imunoenzimáticas, tipicamente utilizadas para determinar a concentração de BBI em alimentos. A próxima estratégia envolveu a suplementação de dieta com 0,1% p/p de BBI e a avaliação do consumo de ração, durante um mês de tratamento. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa no consumo da dieta e no peso dos animais entre os grupos controle e testes, sugerindo que a suplementação de alimentos com BBI pode constituir uma alternativa para estimular o consumo humano desse inibidor. Experimentos futuros poderão elucidar se as preparações de BBI utilizadas como suplementos em alimentos comprometem a palatabilidade dos mesmos. Entretanto, deve ser levada em consideração a observação de que camundongos alimentados oralmente com esse inibidor, produzem anticorpos anti-BBI os quais poderiam limitar a atividade do BBI como agente anti-carcinogênico.

Abstract

Bowman-Birk Inhibitors (BBI) are protein molecules exhibiting two distinct inhibitory domains for serine-proteases. Although the mechanism of action is not entirely understood, these inhibitors have been shown to possess cancer preventive properties. The anti-cancer effects are associated with the use of either the purified BBI or enriched preparations of the inhibitors, commonly called BBIC. Indeed, the use of BBIC from soybeans, in human or animal experimentation, is justified by the cost associated with the production of highly purified BBI. Although BBIC contains a variety of compounds such as lunasin, other trypsin inhibitors and isoflavones, the chymopreventive properties of BBIC are attributed only to the presence of BBI. The first aim of this study was the development of alternative protocols for the production of BBIC of improved quality, using methods typically employed in the processing of a variety of foods. The methods utilized revealed a BBI with a high degree of purity, as indicated by the homogeneity of the product. The major alteration of the classic isolation protocol consisted of the addition of EDTA or citrate during heat treatment of the protein extract. As judged by SDS-PAGE analyses, the recovered BBI was of demonstrably higher purity. It was hypothesized that the use of chelating agents promoted destabilization of contaminant proteins, which lead to their removal by precipitation. The purified BBI was further characterized and identified by trypsin/chymotrypsin inhibition assays, reversed-phase chromatography and mass spectrometry. In parallel, the antibodies produced against *M. axillare* BBI displayed cross-reactivity against BBI purified from soy, a fact that demonstrates their usefulness for the identification of BBI present in the preparations by Western blot. This observation might be attributed to the highly conserved structure of BBI from these plants. In contrast, both *Glycine max* BBI (BBIS) and a synthetic peptide corresponding to the chymotrypsin inhibition head of BBI demonstrated a comparatively lower immunogenicity than *Macrotyloma axillare* BBI (BBIM). The third goal was the validation of a method for the quantification of active BBI present in foods through the use of inhibition assays. The employed method was straightforward and demonstrated increased sensitivity, which was comparable to that of immunoassays typically used to

determine BBI levels in foods. The next strategy involved supplementation of a diet with 0.1 % purified BBI and the evaluation of animal consumption during one month's treatment. The results revealed no significant difference for the consumption of the diet and animal body weight among the test and control groups. These findings suggest that diet supplementation with BBI might constitute an alternative to stimulate increased human intake of this inhibitor. Future experiments will also elucidate whether the BBI preparation could be used as a supplement without compromising food palatability. However, one should bear in mind the observation that, at least in mice, antibodies are produced against BBI given orally, and this fact could limit their activity as anti-carcinogenic agents.

Lista de abreviaturas

%	Porcentagem
μL	Microlitros
ACN	Acetonitrila
AQ	Atividade anti-quimotripsina
AS-BBIM	Anti-soro de BBI de <i>Macrotyloma axillare</i>
AS-BBIS	Anti-soro de BBI de soja <i>Glycine max</i>
AT	Atividade anti-tripsina
BBI	Inibidores do tipo <i>Bowman-Birk</i>
BBIC	Concentrado de BBI
BBIM	Inibidor <i>Bowman-Birk</i> obtido da semente de <i>Macrotyloma axillare</i>
BBIS	Inibidor <i>Bowman-Birk</i> obtido da semente de <i>Glycine max</i>
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
ConA	Concavalina A
DL-BApNA	N-α-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EP	Extrato protéico
EPTT	Extratos Protéicos Tratados Termicamente
ES-MS	<i>Electrospray</i>
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
hKs	Calicreínas teciduais humanas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Kilodalton
KTI	Inibidores de proteases tipo Kunitz

L-BTpNA	N- α -benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida
LCMS-IT-TOF	Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight
mg	Miligramas
MM	Massa Molecular
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
NBT/BCIP	Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato
nM	Nanomolar
PAI	Inibidores de ativadores do plasminogênio
PAQ-1	Peptídeo sintético, SCTFSLPPQCYGGGGG
PMM	Padrão de Massa Molecular
PNM	Leucócitos polimorfonucleares
PSA	Antígeno específico da próstata
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RCBP	Registros de Câncer de Base Populacional
RNA _m	RNA mensageiros
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
tPA	Ativador de plasminogênio tipo tissular
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
uPA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
uPAR	Receptores de uPA
UV	Ultravioleta

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Lista de figuras

Figura 01: Representação esquemática das etapas de progressão tumoral e do envolvimento das proteases no desenvolvimento do câncer	07
Figura 02: Estrutura geral dos KTI	12
Figura 03: Estrutura do BBI da soja, como determinado por Odani e Ikeneka (1973)..	13
Figura 04: Esquema representativo da interação entre tripsina e um inibidor Bowman-Birk	14
Figura 05: Mecanismo do transporte paracelular	19
Figura 06: Fluxograma dos métodos de obtenção do BBI das sementes de soja	26
Figura 07: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) do BBIC obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985)	39
Figura 08: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) dos extratos protéicos da soja	40
Figura 09: Gráfico da estabilidade térmica dos inibidores de tripsina presentes em extratos de soja	42
Figura 10: Gráfico da estabilidade térmica dos inibidores de quimotripsina presentes em extratos de soja	42
Figura 11: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) dos extratos protéicos de soja tratados termicamente à 85°C durante 30 minutos	43
Figura 12: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) dos extratos protéicos de soja submetidos a precipitações com solventes orgânicos	44
Figura 13: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) das preparações de BBI obtidas com suco de limão	45
Figura 14: Gráfico do rendimento das preparações de BBI, considerando a inibição da hidrólise de L -BTpNA pela quimotripsina	46
Figura 15: Gráfico do enriquecimento das preparações de BBI, considerando a inibição da hidrólise de L -BTpNA pela quimotripsina	47
Figura 16: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) do BBIM	49
Figura 17: Alinhamento das seqüências primárias dos BBIS e BBIM através do programa ClustalW	49

Figura 18: Western blot de BBIM e BBIS, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com BBIM	50
Figura 19: Análise cromatográfica em fase reversa do BBI obtido com citrato de sódio e etanol	52
Figura 20: Análise cromatográfica em fase reversa da preparação de BBI submetida a cromatografia de troca iônica	52
Figura 21: Análise cromatográfica em fase reversa da amostra referente ao pico com tempo de retenção 9,5 minutos	53
Figura 22: Identificação do isolado de BBI por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo <i>electrospray</i>	53
Figura 23: Análise cromatográfica em fase reversa do BBIC obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985)	54
Figura 24: Gráfico das atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina de amostras contendo diferentes concentrações de BBI purificado	55
Figura 25: Gráfico das atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina de amostras de leite de soja suplementados com diferentes concentrações de BBI purificado	56
Figura 26: Consumo de rações por grupo de camundongos	58
Figura 27: Monitoramento do peso de camundongos alimentados com rações suplementadas ou não com BBI	59
Figura 28: Western blot de BBIM e BBIS, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com BBIS	60
Figura 29: Western blot de BBIM e BBIS, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com peptídeo sintético SCTFSLPPQCYGGGGG	60
Figura 30: Dot blot de inibidores de proteases em suas formas nativas e reduzidas/alquiladas	61
Figura 31: Dot blot de amostras de leite de soja enriquecidas com diferentes concentrações de BBI, utilizando anti-soro de camundongos imunizados com BBIM	62
Figura 32: Dot blot de inibidores de proteases, utilizando soro de camundongos alimentados com rações suplementadas ou não suplementadas com BBI	63

Lista de tabelas

Tabela 1: Quantificação do BBI em alimentos derivados de soja baseada em ensaios de atividade anti-quimotripsina57

Tabela 2: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina (Método 1)79

Tabela 3: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina (Método 1).....79

Tabela 4: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina (Método 2)80

Tabela 5: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina (Método 2).....80

Tabela 6: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina (Método 3)81

Tabela 7: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina (Método 3).....81

Tabela 8: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina (Método 4)82

Tabela 9: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina (Método 4).....82

Tabela 10: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina (Método 5)83

Tabela 11: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina (Método 5).....83

Tabela 12: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina (Método 6)84

Tabela 13: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina (Método 6).....84

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Epidemiologia do câncer

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. Segundo as últimas estatísticas, o câncer é responsável por mais de 7 milhões de óbitos a cada ano, e representa cerca de 13% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, mais de 70% das mortes provocadas por essa patologia ocorrem em países em desenvolvimento, onde os recursos disponíveis para prevenção, diagnóstico e tratamento são limitados ou inexistentes (WHO, 2010).

A incidência e prevalência de câncer estão relacionadas com o progressivo aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional (INCA, 2006). A redefinição dos padrões de vida desencadeada pelo processo de globalização industrial conduziu a uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo da população de vários países (Waters, 2001). Esse processo de reorganização global foi determinante para uma grande modificação nos perfis demográficos. Tal modificação, caracterizada pela redução das taxas de mortalidade e natalidade, provocou um aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional, levando ao aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, especialmente as cardiovasculares e o câncer (INCA, 2006).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde (MS), se baseia em dados obtidos através dos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) e do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), para descrever a magnitude e o impacto dessa doença no país. Segundo dados do instituto as estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil para o ano de 2010, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos, dos quais são esperados 236.240 casos do sexo masculino e 253.030 do feminino. O câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de

próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2009).

Diante das taxas de incidência e estimativas futuras podemos perceber que o câncer representa um verdadeiro problema de saúde pública em todo o mundo. Nesse cenário, torna-se fundamental que mais recursos e esforços sejam direcionados no sentido de orientar as estratégias de prevenção e controle dessa doença.

1.2. Biologia do câncer

Câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo progressivo acúmulo de mutações no genoma de uma célula (WHO, 2002). Essas sucessivas alterações genéticas podem converter uma célula normal em uma célula transformada, que não é capaz de responder aos sinais de controle de proliferação, diferenciação e morte (Jorde *et al.*, 2000).

A carcinogênese é um processo complexo, ainda pouco compreendido, que ocorre em múltiplas etapas (Osborne *et al.*, 2004). A iniciação desse processo ocorre quando uma célula com danos genéticos escapa dos mecanismos homeostáticos do organismo e torna-se capaz de proliferar independente dos sinais celulares específicos (Macleod, 2000). Os danos genéticos responsáveis pelo surgimento do câncer ocorrem preferencialmente em genes que regulam a proliferação celular, como os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e microRNAs. Esses danos resultam em vantagens essenciais na promoção tumoral como aumento da proliferação, inibição da apoptose, maior capacidade de invasão e metástase, entre outras (Croce, 2008).

Proto-oncogenes são genes celulares normais que codificam proteínas envolvidas na regulação do crescimento, diferenciação e morte celular (Weinberg, 1983). Esses genes podem ser classificados em diferentes grupos, baseados nas propriedades funcionais de seus produtos protéicos: fatores de transcrição, remodeladores de cromatina, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, transdutores de sinais e reguladores de apoptose (Croce, 2008). Quando os proto-oncogenes encontram-se mutados ou com sua expressão descontrolada por algum mecanismo de rearranjo gênico, diz-se que estão ativados e passam a receber o nome de

oncogenes. Uma vez ativados, os oncogenes hiper-expressam seus produtos protéicos (Borrello *et al.*, 2008) e ativam ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), conduzindo a célula a um processo de proliferação desregulada, propiciando o desenvolvimento de uma neoplasia de caráter maligno (Osborne *et al.*, 2004; Tsatsanis and Spandidos, 2000).

Os genes supressores de tumor codificam proteínas que atuam no controle da divisão celular, prevenindo uma proliferação celular excessiva. A perda da função desses genes e/ou a inibição de seus produtos por onco-proteínas mutadas, comuns no processo carcinogênico, levam à desregulação da proliferação celular, com conseqüente crescimento celular descontrolado, desencadeando displasias e/ou tumores malignos (Macleod, 2000).

O gene supressor de tumor mais bem estudado em tumores humanos é o TP53. Esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear (p53) que tem papel ativo no bloqueio do ciclo celular e indução da expressão de genes de reparo de DNA lesado (Brenna and Syrjanen, 2003; Finlay *et al.*, 1989). Quando ocorre a inativação do gene TP53, observa-se uma maior susceptibilidade ao aparecimento do câncer devido à extinção de um dos mecanismos de defesa celular (Levine, 1992; Levine *et al.* 1991).

Os genes de microRNAs, ao contrário dos genes supressores de tumor e oncogenes, não codificam proteínas (Croce, 2008). O produto desses genes consiste em moléculas de ácido ribonucléico (RNA) de 19-25 nucleotídeos que atuam como potentes reguladores negativos pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais. Os microRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida em RNA mensageiros (RNAm) alvos. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes alvos, raramente afetando o nível de expressão transcricional (Kim, 2005). A regulação pós-transcricional exercidas pelos microRNAs na região 3' não traduzida depende do grau de complementaridade com o RNAm alvo, podendo ocorrer por inibição traducional ou degradação do RNAm. O pareamento de modo imperfeito com o RNAm acarreta a inibição traducional do alvo, sendo o mecanismo principal de atuação dos microRNAs em mamíferos (Brennecke *et al.*, 2005).

Através da regulação global da expressão gênica celular e associação a diferentes funções, torna-se evidente que os microRNAs possam alterar a progressão de

diversas patologias. Alguns estudos tem demonstrado uma associação dos microRNAs com o desenvolvimento e progressão do câncer (Calin *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005), podendo ser ativados ou inibidos em diferentes tecidos tumorais (Volinia *et al.*, 2006). Quando ativados atuam como oncogenes e inibidos funcionam como genes supressores de tumores (Croce, 2008).

Para a progressão da carcinogênese, além da perda de controle da proliferação, as células cancerosas induzem a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais do próprio organismo. Esse processo, chamado de angiogênese, constitui um importante mecanismo para o crescimento tumoral, sendo responsável pela efusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos das células neoplásicas em proliferação (Belting *et al.* 2004, Tandle *et al.* 2004).

A angiogênese é um evento essencial para o desenvolvimento normal dos tecidos e homeostase do organismo (Folkman 1995, 2007). Em condições fisiológicas, esse processo é mantido por um equilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos, que garante que a neovascularização ocorra de maneira ordenada, regulada e autolimitada. Já na angiogênese patológica, o desequilíbrio entre os fatores angiogênicos provoca uma multiplicação vascular descontrolada que culmina com a formação de vasos sanguíneos estruturalmente e funcionalmente desordenados (Hasina and Lingen, 2001; Maeda *et al.*, 1995).

As células tumorais começam a promover a angiogênese já nas fases iniciais da carcinogênese. O primeiro passo da neovascularização é a ativação de células endoteliais quiescentes pelos fatores pró-angiogênicos liberados pelas células tumorais ou pelas células do estroma adjacente (Poon *et al.*, 2003). Esta ativação ocorre em resposta a estímulos estressantes como a hipóxia (Amirkhosravi *et al.*, 1998).

Nestas condições, as células endoteliais são estimuladas a degradar a membrana basal e a matriz extracelular e proliferar. A degradação e a remodelação da matriz permitem que as células endoteliais em proliferação migrem através do tecido e formem estruturas tubulares. Após a formação dessas estruturas, observam-se ainda recrutamento de estruturas adjacentes para a sustentação dos vasos neoformados, anastomose e desenvolvimento da membrana basal (Fox, 2009; Poon *et al.* 2003; Ramsden, 2000).

Evidências experimentais demonstram que a angiogênese, além de constituir um importante mecanismo para o crescimento tumoral, estabelece condições favoráveis para a disseminação metastática. À medida que ocorre a expansão da vascularização, observa-se um aumento da superfície para o escape de células tumorais para a circulação (Weidner *et al.*, 1991).

A metástase é um processo complexo, constituído de várias etapas, que resulta das interações entre as células cancerosas e o microambiente onde as células se encontram. Para desenvolver uma metástase, as células tumorais devem ser capazes de perder as interações inter-celulares, migrar pela matriz extracelular, invadir vasos sanguíneos e linfáticos (intravasão), sobreviver na circulação, sair da vasculatura (extravasar) e invadir e proliferar no parênquima do órgão-alvo (Koblinski *et al.*, 2000; Nyberg *et al.*, 2006). Vários estudos recentes indicam que as proteases participam de praticamente todos os passos do crescimento tumoral, inclusive do processo metastático (Koblinski *et al.*, 2000; Nyberg *et al.*, 2006).

1.3. Papel das proteases no desenvolvimento do câncer

As proteases, enzimas que hidrolizam ligações peptídicas, representam aproximadamente 2% do total de proteínas presentes em todos os tipos celulares (Puente *et al.*, 2003). São geralmente sintetizadas na forma latente (zimogênio) e transformadas na forma ativa por ação de outras proteases ou através de um processo autocatalítico (Koblinski *et al.*, 2000).

De acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada, as proteases podem ser divididas em exo e endopeptidases. As exopeptidases atuam a partir das regiões N e/ou C terminal das cadeias polipeptídicas e as endopeptidases clivam as ligações peptídicas localizadas internamente (Turk, 2006). Considerando os diferentes mecanismos catalíticos de hidrólise sobre o sítio ativo, as endopeptidases podem ser ainda divididas em 5 subclasses: metalo-proteases, serino-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases e treonino-proteases (Koblinski *et al.*, 2000; Turk, 2006).

As proteases são fundamentais para a manutenção do metabolismo normal das células, pois estão envolvidas em vários processos fisiológicos tais como digestão,

remodelação de tecidos, coagulação sanguínea, defesa do organismo, desenvolvimento embrionário, morfogênese de órgãos e ativação de pró-enzimas (Bode and Huber, 1991; Losso, 2008). A homeostase celular requer a existência de um equilíbrio entre as proteases e seus inibidores endógenos. Caso esse equilíbrio seja perdido em favor das proteases, poderá haver uma desregulação das proteólises que desencadeará processos de destruição irreversível de tecidos, tais como inflamação, artrites reumatóides, angiogênese patológica e crescimento tumoral ou metástase (Losso, 2008).

Uma das primeiras associações entre as proteases e o câncer foi realizada em 1946, quando Fischer propôs que a atividade proteolítica poderia ser responsável pela degradação da matriz extracelular e subsequente invasão do tumor em tecidos normais. Acreditava-se que as enzimas proteolíticas contribuíam para o desenvolvimento do câncer apenas nas etapas de invasão tumoral e metástase (Koblinski *et al.*, 2000). Atualmente, sabe-se que as proteases participam de todas as etapas de progressão do tumor, incluindo os processos de proliferação, adesão, migração, angiogênese, apoptose e evasão do sistema imune (Figura 1) (Laufs *et al.*, 2006; Nyberg *et al.*, 2006).

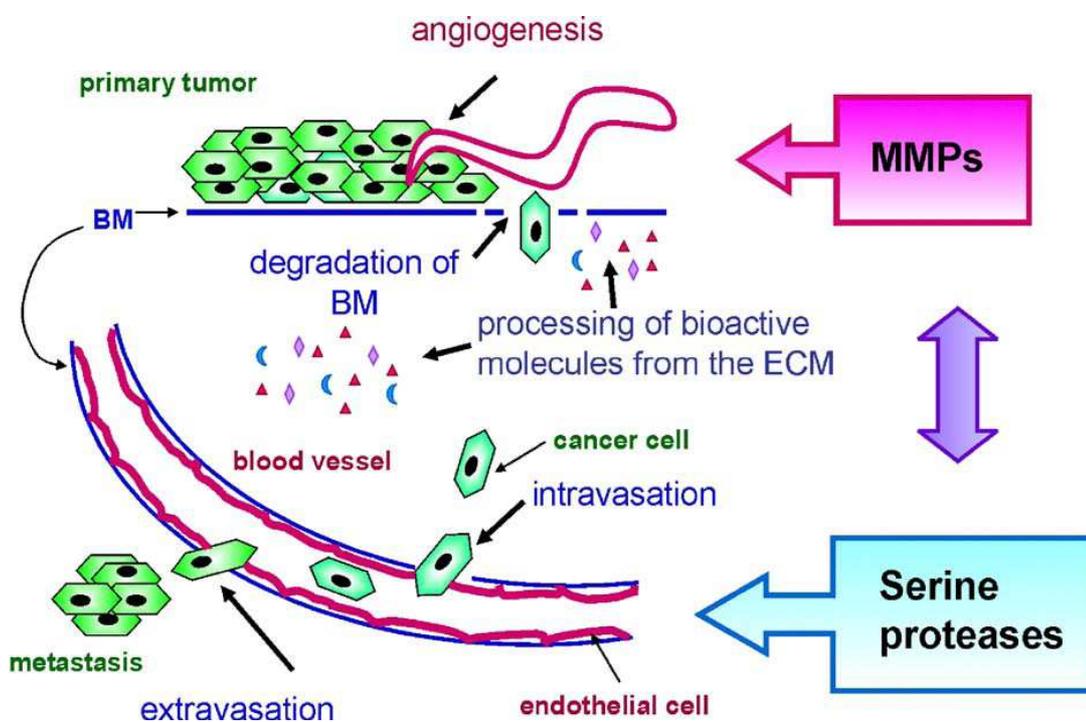


Figura 01: Representação esquemática das etapas de progressão tumoral e do envolvimento das proteases no desenvolvimento do câncer. Adaptado de Acta Universitatis Ouluensis, Nyberg, P: Matrix degrading proteases and collagen-derived angiogenesis inhibitors in the regulation of carcinoma cell growth, <http://herkules oulu.fi/isbn9514276612>. BM: membrana basal; ECM: matriz extra celular.

Uma das principais etapas da progressão tumoral é a degradação proteolítica da matriz extracelular, pois este processo desempenha papel fundamental na migração, invasão e metástase tumoral. As serino e as metalo-proteases são exemplos de famílias envolvidas nos processos fisiológicos e patológicos de degradação da membrana basal e matriz extracelular (Nyberg *et al.*, 2006).

1.3.1. Serino-proteases

As serino-proteases são hidrolases que utilizam o grupo hidroxila do resíduo de serina na posição 195 para clivar ligações amídicas em proteínas e peptídeos (Sergei *et al.*, 2005). Apesar do sítio ativo das serino-proteases ser bastante conservado no que se refere à tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195), diferenças de especificidade pelo substrato são nitidamente observadas dentro dessa família (Ishida, 2006). Essas diferenças de especificidade devem-se à natureza dos aminoácidos do sítio catalítico que interagem com os resíduos complementares dos substratos. O acesso do substrato à região catalítica da enzima e a complementaridade estrutural dessas moléculas são pré-requisitos que determinam o processo de proteólise e a eficiência da interação enzima-substrato (Liu *et al.*, 2006; Perona *et al.*, 1995).

Quase um terço de todas as proteases podem ser classificadas como serino-proteases (Gettins, 2002). Essas enzimas possuem massas moleculares que variam de 19 a 110 kDa e apresentam atividade ótima em pH alcalino e temperatura fisiológica (Antão and Malcata, 2005). Entre as principais enzimas pertencentes a esse grupo estão quimotripsina e tripsina (Losso, 2008), ambas sintetizadas e secretadas pelo pâncreas exócrino sob a forma de zimogênios (Mikes *et al.* 1966, Walsh and Neurath 1964). Apesar de apresentarem alta similaridade estrutural, a tripsina e a quimotripsina reconhecem substratos diferentes. A tripsina hidrolisa, preferencialmente, as ligações peptídicas no lado carboxila de L-aminoácidos básicos, como a arginina (Arg) e a lisina (Lys) enquanto as quimotripsinas catalisam a hidrólise de ligações após resíduos de leucina, fenilalanina e tirosina (Voet *et al.*, 2000).

As serino-proteases, assim como as demais proteases, estão envolvidas em vários processos fisiológicos e possuem atividade regulada por inibidores específicos. A

proteólise desregulada causada pelo desequilíbrio biológico entre as serino-proteases e seus inibidores pode desencadear vários processos patológicos, entre eles o câncer (Powers *et al.*, 2002). Vários estudos já demonstraram que a expressão e a atividade de serino-proteases estão associadas a várias fases de progressão do tumor, incluindo crescimento, invasão e angiogênese (Affara *et al.*, 2009; Borgono *et al.*, 2007).

A plasmina e os ativadores de plasminogênio são as serino-proteases associadas à progressão tumoral mais bem estudadas. Eles formam um importante sistema desencadeador de proteólise na região pericelular que culmina em uma série de eventos associados ao crescimento tumoral, metástase e angiogênese (Nyberg *et al.*, 2006). Esse sistema é composto de plasminogênio ativado proteoliticamente pelo ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) e ativador de plasminogênio tipo tissular (tPA), dois inibidores de ativadores do plasminogênio (PAI 1 e PAI 2), receptores de uPA (uPAR) e plasmina (Duffy and Duggan 2004). Os ativadores de plasminogênio muitas vezes ativados por outras proteases, como a catepsina B, são responsáveis pela conversão de plasminogênio em plasmina, que por sua vez é capaz de degradar vários componentes da matriz extracelular e ativar metalo-proteases (Koblinski *et al.*, 2000). Diante da associação desse sistema com o processo carcinogênico, antagonistas de uPA/uPAR/plasmina estão sendo desenvolvidos como estratégias terapêuticas para inibir a progressão tumoral (Nyberg *et al.*, 2006).

Além do sistema ativadores de plasminogênio/plasmina, as calicreínas teciduais humanas (hKs) também são exemplos de serino-proteases associadas à carcinogênese. Evidências acumuladas indicam que as hKs são importantes em muitos processos relacionados ao progressão tumoral, incluindo ativação de cascatas de proteases, crescimento celular, angiogênese, invasão e metástase (Borgono and Diamandis, 2004). Nos últimos anos, vários membros dessa família foram relatados como sendo potenciais biomarcadores do câncer. O membro mais conhecido, o antígeno específico da próstata (PSA), é usado como marcador para o diagnóstico e monitoramento do câncer prostático (Rittenhouse *et al.*, 1998).

A tripsina também é uma serino-protease envolvida nos processos de progressão tumoral. Vários estudos demonstraram que a tripsina é uma enzima amplamente expressa em células e tecidos tumorais (Kato *et al.*, 1998; Koshikawa *et al.*, 1998). Essa protease, além de contribuir para a degradação da matriz extracelular, ativa metalo-

proteases e modula o comportamento celular através da ativação de vários receptores, tais como os receptores de plasminogênio e de fatores de crescimento.

Diante da grande relevância das proteases em diversas etapas do desenvolvimento tumoral, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos recomendou que as pesquisas para a cura dessa patologia deveriam envolver: I) identificação de fontes de inibidores de proteases; II) determinação da concentração de inibidores de proteases em alimentos; III) determinação da relação entre a concentração de inibidores de proteases na dieta e prevalência de câncer na população humana; IV) determinação da eficácia dos inibidores de proteases em modelos animais e V) investigação do mecanismo de ação dos inibidores de proteases (Losso, 2008).

1.4. Inibidores de proteases

Os inibidores de enzimas proteolíticas mais estudados até o momento estão amplamente distribuídos em várias plantas, principalmente naquelas pertencentes às famílias Fabaceae, Poaceae e Solanaceae. O alto teor desses inibidores em muitas espécies de plantas tem despertado o interesse quanto à sua função fisiológica, sugerindo atuação nos mecanismos de defesa contra fitófagos e parasitas. Além disso, os inibidores presentes nas sementes das plantas podem controlar as enzimas proteolíticas durante a dormência e a germinação, prevenindo a hidrólise prematura do material de reserva e assim controlar a mobilização de proteínas durante esses períodos (Baek *et al.*, 1994; Hammond *et al.*, 1984).

O interesse na caracterização de inibidores de proteases deve-se não apenas às funções biológicas que eles exercem nas plantas, mas também à sua utilização na prevenção e/ou tratamento de várias patologias (DeClerck and Imren, 1994; Oliva *et al.*, 2000). Estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram que o consumo de alimentos ricos em inibidores de proteases está relacionado com a redução da incidência de vários tipos de cânceres (Kelloff *et al.*, 2000; Stewart and Coates, 2005).

A classificação desses inibidores é baseada na especificidade para cada uma das quatro classes de enzimas proteolíticas: serino, cisteíno, aspártico e metalo-proteases

(Haq *et al.*, 2004). Os inibidores de proteases mais bem estudados e caracterizados até o momento, são os inibidores de serino-proteases, os quais apresentam uma inibição estritamente competitiva (Richardson, 1991). As famílias de inibidores são classificadas de acordo com a homologia na estrutura primária, posição dos sítios reativos e localização das pontes dissulfeto; as quatro mais conhecidas são os inibidores de tripsina do tipo *Kunitz* de soja; os inibidores *Bowman-Birk* e os inibidores do tipo I e II presentes na batata.

A soja é um exemplo de leguminosa rica em inibidores de serino-proteases, os quais representam aproximadamente 6% do total de proteínas encontradas em sua composição. Dentre esses inibidores, os mais bem caracterizados são os inibidores de tripsina do tipo Kunitz (KTI) e os inibidores Bowman-Birk (Kennedy, 1998b).

1.4.1. Inibidores de tripsina do tipo kunitz

Os inibidores de proteases tipo Kunitz (KTI), isolados inicialmente em *Glycine max*, são encontrados em inúmeras subfamílias de leguminosas, entre elas: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae (Richardson, 1977). Os membros dessa família de inibidores são na maioria ativos contra serino-proteases (Gomes *et al.*, 2005; Heibges *et al.*, 2003), mas também podem inibir catepsina D e amilases de insetos e plantas (Ritonja *et al.*, 1990; Rodenburg *et al.*, 1995).

Os KTI encontrados na soja foram isolados e caracterizados por Kunitz em 1947. Eles são compostos por 181 resíduos de aminoácidos, apresentam uma massa molecular de aproximadamente 21-22 kDa e possuem duas pontes dissulfeto (Cys39-Cys86 e Cys136-Cys145). A estrutura tridimensional desses inibidores é formada por 12 conformações β anti-paralelas, conectadas por longas alças, e uma 3_{10} -hélice. O inibidor pode ser dividido em três subdomínios, cada um contendo cerca de sessenta aminoácidos. Cada subdomínio consiste de quatro folhas- β conectadas por longas alças, estruturalmente organizadas como A β 1, A β 2, A β 3, A β 4, onde “A” refere-se às alças que conectam as folhas- β (Figura 2) (Song and Suh, 1998).

Alguns estudos sobre o sítio reativo dos inibidores de tripsina tipo Kunitz da soja demonstraram que os aminoácidos, Arg63 ou Lys63 (P1) e Ile64 (P1'), são

essenciais para a atividade desses inibidores (Kowalski and Laskowski, 1976; Ryan, 1981). Os KTI interagem com a enzima através dos resíduos de aminoácidos Arg ou Lys os quais são complementares ao sítio catalítico S1, composto por resíduos que determinam a especificidade do inibidor. Essa interação direta do resíduo do sítio reativo do inibidor com o sítio catalítico da enzima caracteriza um mecanismo de inibição competitivo, comum para inibidores de tripsina da família Kunitz (Bode and Huber, 2000; Franco *et al.*, 2002).

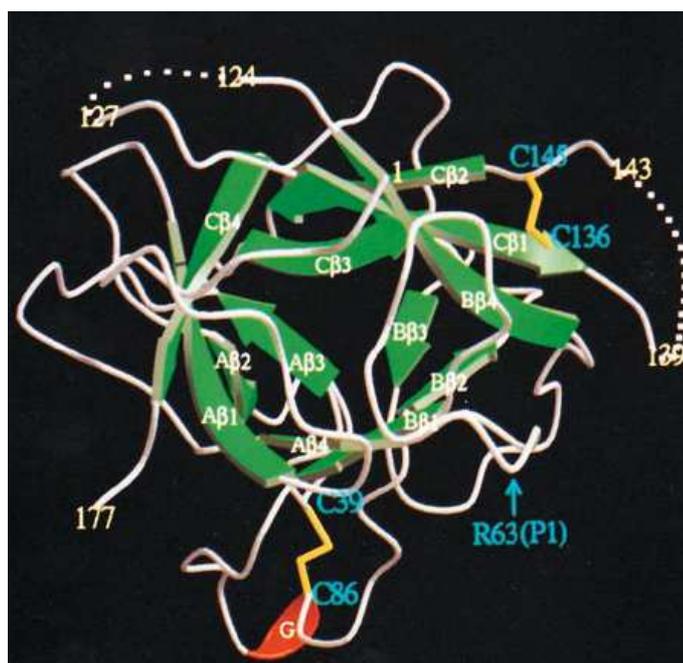


Figura 02: Estrutura geral dos KTI. As setas verdes representam os subdomínios formados por folhas- β e a fita vermelha representa a 3_{10} -hélice. O resíduo Arg63 é indicado pela cor azul e as pontes dissulfeto formadas entre os resíduos C39-C86 e C136-C145 são indicadas pela cor amarela (Song and Suh, 1998).

1.4.2. Inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk

Os inibidores do tipo *Bowman-Birk*, comumente chamados de BBI, foram isolados pela primeira vez em sementes de soja por *Bowman*, em 1946, e caracterizados por *Birk*, em 1961, sendo posteriormente identificados em outras leguminosas (Norioka and Ikenaka, 1983; Norioka *et al.*, 1982); e gramíneas (Odani *et al.*, 1986). Inicialmente, acreditava-se que os BBI eram expressos apenas em sementes (Hammond

et al., 1984). Entretanto, estudos com milho, alfafa e arroz mostraram que além de estarem presentes em sementes, esses inibidores são expressos em folhas e caules submetidos à danos teciduais (McGurl *et al.*, 1995; Rakwal *et al.*, 2001; Rohrmeier and Lehle, 1993).

Os BBI encontrados na soja são geralmente compostos por 71 resíduos de aminoácidos e apresentam uma massa molecular de aproximadamente 8 kDa (Losso, 2008). Esses inibidores são caracterizados pela presença de 7 pontes dissulfeto que permitem a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois domínios independentes, um capaz de inibir tripsina e o outro com atividade inibitória sobre tripsina, quimotripsina ou elastase (Figura 3A e 3B) (Deshimaru *et al.* 2004, Odani and Ikenaka 1977). Além de possibilitarem a formação desta estrutura de domínios independentes, as pontes dissulfeto fornecem ao BBI uma rigidez estrutural que garante a atividade inibitória até mesmo em condições desfavoráveis, como temperaturas elevadas e extremos de pH (Weder, 1986).

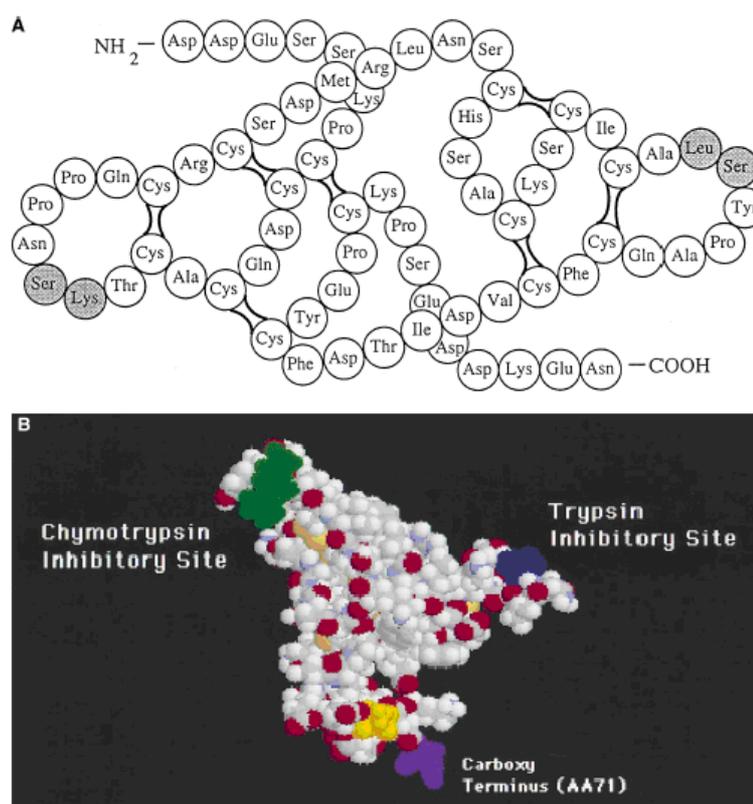


Figura 03: Estrutura do BBI da soja, como determinado por Odani e Ikeneka (1973). A - Em tom de cinza, do lado direito, o sítio inibitório para a quimotripsina (Leu – Ser), e do lado esquerdo o sítio inibitório para a tripsina (Lys – Ser). B - Estrutura tridimensional do BBI em solução. O BBI da soja é uma proteína de 71 aminoácidos (AA). A região carboxi-terminal da proteína é representada em roxo (AA71), e a região N-terminal é representada em amarelo pelo AA1. O sítio inibitório para a quimotripsina, AA43-44 é representado em verde e o sítio inibitório para tripsina é representado em azul, AA16-17. Adaptado de Kennedy, A. R, *Pharmacology & Therapeutics*, 78:3:167-209,1998.

Estudos sobre a estrutura dos BBI de soja revelaram que cada sítio reativo é formado por 9 resíduos de aminoácidos, os quais são delimitados por pontes dissulfeto (Odani and Ikenaka, 1973). As posições dos aminoácidos, pertencentes ao inibidor protéico, são definidas de acordo com o aminoácido que interage com o resíduo catalítico da enzima proteolítica. Esse aminoácido sofrerá um ataque nucleofílico sobre a carbonila da ligação peptídica, que será quebrada. O aminoácido presente nessa posição é denominado P1 e aqueles que se situarem à montante da carbonila envolvida na hidrólise serão numerados gradativamente, P2, P3, e assim sucessivamente; e os aminoácidos que se situarem à jusante daquele serão numerados da seguinte forma: P1', P2' e assim por diante. Os sítios de interação da enzima em posições correspondentes aos aminoácidos do peptídeo que se acomodam no sítio catalítico são denominados S1, S2, S1', S2', respectivamente de acordo com a Figura 4.

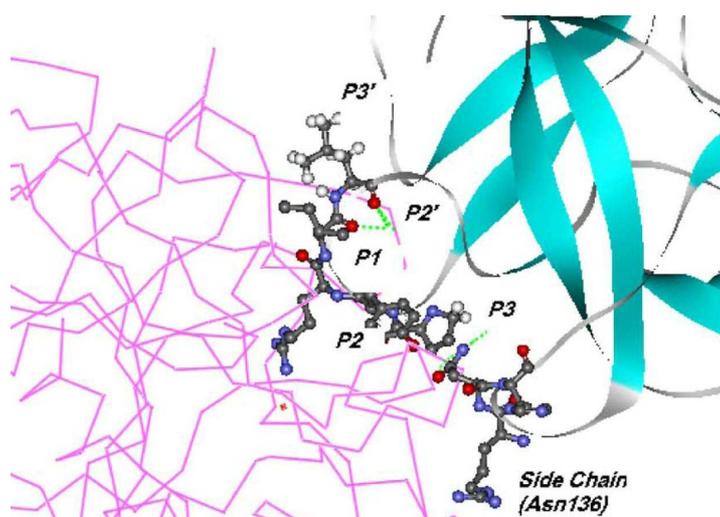


Figura 04: Esquema representativo da interação entre tripsina (domínios identificados em magenta e verde) e um inibidor Bowman-Birk (representado em modelo de bastões e bolas), segundo (Sattar and cols., 2004)

A complementaridade estrutural do sítio reativo do BBI ao sítio ativo da enzima a ser inibida permite a ocorrência de uma ligação reversível de alta afinidade entre o inibidor e a protease (Chen *et al.*, 1992). O encaixe adequado nos sítios enzimáticos impede as mudanças conformacionais necessárias à catálise, gerando um complexo

típico enzima-inibidor com uma barreira energética desfavorável à hidrólise (Read, 1986). Estudos mostram que duas enzimas podem ser simultaneamente inibidas pelo BBI em sua forma monomérica. Acredita-se que ocorra uma pequena mudança conformacional no inibidor com o objetivo de acomodar as duas enzimas, havendo então um comportamento cooperativo nessas ligações (Prakash *et al.*, 1997). Além disso, Jensen e colaboradores (1996) afirmam que após a formação do complexo, o BBI é clivado muito lentamente.

Embora as análises das seqüências das alças de inibição revelem que essas sejam extremamente conservadas (McBride *et al.*, 1998; Odani and Ikenaka, 1973) os BBI apresentam variações pontuais muito importantes que podem modificar suas especificidades; as posições mais relevantes são P1 e P2'. Na natureza ocorrem inibidores que tipicamente tem os seguintes resíduos em P1 que determinam a especificidade primária para as enzimas: leucina e fenilalanina (α -quimotripsina), alanina (elastase pancreática), arginina ou lisina (tripsina). Variações na posição P2' resultam em diferenças na estabilidade do inibidor quanto à sua velocidade de hidrólise (Gariani and Leatherbarrow, 1997; Gariani *et al.*, 1999).

Estudos de substituições na posição P2' de peptídeos sintéticos promoveram alterações significativas na constante de inibição, variando entre 9 nM e 1 mM, confirmando a grande influência desta posição na interação com a enzima. A substituição na posição P2' pelo aminoácido isoleucina resulta em um valor baixo da constante de inibição, da mesma maneira as substituições por aminoácidos com cadeia lateral alifática melhoram bastante a potência inibitória. Aminoácidos carregados positivamente como arginina e lisina são bem tolerados e produzem constantes relativamente baixas; já as substituições com cadeias laterais dotadas de cargas negativas resultam em inibidores pobres, o resíduo de glutamato, por exemplo, praticamente não possui atividade inibitória, apresentando um valor de constante de inibição superior a ordem de 1 mM (Gariani *et al.*, 1999). Variações na posição P2' dos inibidores para tripsina são muito importantes, visto que S2' constitui o sítio alostérico da tripsina (Andrade *et al.*, 1990). Dessa forma, substituições promovidas nesta posição devem influenciar muito no valor das constantes de inibição.

Múltiplas formas de BBI podem ser encontradas em várias espécies de leguminosas. Esse polimorfismo pode ser atribuído à expressão de diferentes genes e às

modificações pós-traducionais em regiões carboxi- e amino-terminal dos inibidores durante o desenvolvimento das sementes (Clementea and Domoney, 2006). Apesar dos BBI serem produtos de uma família de multi-genes e possuírem variações nas seqüências de aminoácidos, eles apresentam sítios reativos bastante conservados (Clementea and Domoney, 2006; Losso, 2008).

Até o momento, foram identificados 7 iso-inibidores do tipo Bowman-Birk em *Glycine max* (BBI-A, -B, -CI/II, -DI/II e -EI) (Deshimaru *et al.*, 2004), mas apenas 5 deles foram isolados (BBI-A, -B, -CII, -DII e -EI). Através da caracterização dos inibidores isolados, Odani e Ikenaka (1977,1978) verificaram similaridades entre as composições e propriedades inibitórias dos BBI-A e BBI-B, ambos capazes de inibir tripsina e quimotripsina. Os BBI-EI e -DII, apesar de apresentarem estruturas de tamanhos diferentes provocadas por modificações pós-traducionais de -DII, possuem capacidades inibitórias apenas para tripsina. Já os BBI-CII não apresentam analogia em relação às propriedades inibitórias das demais formas, sendo capazes de suprimir a atividade de tripsina e elastase.

1.5. Propriedades funcionais e fisiológicas do BBI

O significado fisiológico dos BBI no reino vegetal está associado com as seguintes funções: regulação das proteases endógenas, reservatório de aminoácidos sulfurados e defesa contra ataques de patógenos e insetos (Ryan *et al.*, 1990). Esses inibidores funcionam como substratos específicos das proteases digestivas dos insetos formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta. Através da inibição das enzimas digestivas, os inibidores de proteases causam uma deficiência de aminoácidos e assim influenciam o crescimento e desenvolvimento dos insetos (Tanaka *et al.*, 1996).

Muitos fitoquímicos usados pelas plantas para sua própria proteção são também usados para regular o sistema de resposta adaptativa em mamíferos (Losso, 2008). Diferentes tipos de inibidores de proteases, encontrados em uma variedade de espécies do reino vegetal, apresentam atividade anti-carcinogênica. Nesse contexto, os inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk surgiram como uma dos mais potentes agentes

quimiopreventivos do câncer, sendo capaz de prevenir ou suprimir os processos carcinogênicos em vários modelos *in vitro* e *in vivo* (Armstrong *et al.* 2000a; Armstrong *et al.* 2000b; Kennedy 1998b; Yavelow *et al.* 1985).

A capacidade do BBI de prevenir a carcinogênese tem sido estudada extensivamente, tanto em sua forma purificada quanto na forma de extrato protéico de soja enriquecido de BBI, chamado de BBI concentrado (BBIC) (Kennedy, 1998b). A habilidade do BBI para suprimir os processos carcinogênicos parece estar relacionada à presença do sítio reativo inibidor de quimotripsina. Yavelow e colaboradores (1985) demonstraram que moléculas de BBI modificadas enzimaticamente, com atividade inibitória apenas para quimotripsina, foram completamente eficazes como supressores da transformação maligna de células *in vitro* induzida por radiação. Apesar das atividades anti-tumorais não terem sido observadas em moléculas de BBI modificadas, com atividade inibitória apenas para tripsina, as proteases tripsina-símile envolvidas na carcinogênese devem ser consideradas alvos potenciais de proteínas relacionadas ao BBI (Clemente and Domoney, 2006). Alguns estudos revelaram que a atividade proteolítica da tripsina correlaciona-se com a agressividade do tumor, pois está intimamente ligada à ativação de receptores envolvidos com processos de adesão e proliferação de células tumorais (Burger, 1970; Miyata *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 1998).

Vários pesquisadores verificaram que os BBIC possuem a mesma capacidade anti-tumoral que o BBI purificado em vários modelos *in vitro* e *in vivo* (Armstrong *et al.*, 2000a; Kennedy and Wan 2002). Ambas as formas de BBI suprimem a carcinogênese em diferentes tipos de células, tecidos e sistemas orgânicos (Kennedy, 1998a). Estudos *in vitro* demonstraram que o BBI é capaz de suprimir a transformação maligna de células C3H/10T $\frac{1}{2}$ induzidas por raios-X (Yavelow *et al.*, 1985), inibir a produção de radicais ânions superóxidos em células HL-60 diferenciadas (Ware *et al.*, 1999) e potencializar a morte de células tumorais induzida por radiação e pela utilização de cisplatina (Zhang *et al.*, 1999). Experimentos de longa duração realizados em camundongos, ratos e hamster revelaram que os BBIC oferecidos oralmente a esses animais apresentaram efeitos clínicos positivos sobre o câncer e não desencadearam alteração histopatológica, mesmo em concentrações muito elevadas (Kennedy, 1998b; Rossman and Troll, 1980; St Clair *et al.*, 1990a; St Clair *et al.*, 1990b).

Baseado nestas evidências o BBI alcançou status de “novo medicamento investigativo” pela Food and Drug Administration (FDA) em 1992, e testes para avaliar a atividade anti-carcinogênica do BBIC começaram a ser realizados em populações humanas (Kennedy, 1998b). Malkowicz e colaboradores (2001) realizaram ensaios clínicos de fase I com 19 pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna e observaram que após 6 meses de tratamento com BBIC esses pacientes apresentaram redução dos níveis plasmáticos de PSA e do tamanho das lesões. Os resultados dos estudos clínicos de fase I e II com pacientes portadores de leucoplasia oral mostraram que os pacientes tratados com BBIC tiveram melhora do quadro clínico, boa tolerância ao inibidor administrado oralmente e não apresentaram nenhum sinal de toxicidade (Armstrong *et al.*, 2000a; Armstrong *et al.*, 2000b).

1.6. Farmacocinética dos inibidores Bowman-Birk

Os BBI ingeridos em dietas são bastante resistentes aos processos digestivos e atingem o intestino com suas estruturas praticamente inalteradas (Yavelow *et al.*, 1983). Aproximadamente 50% dos BBI presentes em alimentos da dieta são absorvidos e distribuídos pelo organismo (Billings *et al.*, 1992) e o restante é excretado de forma inalterada nas fezes e urina, até 9 horas após a ingestão (Kennedy, 1998).

Estudos sobre os mecanismos de absorção do BBI sugerem que o mesmo atinge a corrente sanguínea via células do epitélio intestinal (Billings *et al.*, 1991) ou através de mecanismos paracelulares (Billings *et al.*, 1992). Os aminoácidos e as moléculas de glicose presentes nos alimentos são geralmente absorvidos no lúmen intestinal através de transportadores acoplados ao sódio. No entanto, as macromoléculas não são facilmente absorvidas por essa via, podendo atravessar o lúmen intestinal através de mecanismos paracelulares. Quando os transportadores presentes nas membranas das células intestinais estão funcionando na sua capacidade máxima, como após a ingestão de alimentos, uma grande quantidade de sódio penetra no citosol e ocorre um conseqüente influxo de água. Em seguida surgem eventos celulares em resposta à penetração de sódio e água, como o efluxo de sódio pela Na^+/K^+ ATPase, e entrada de cálcio. Em resposta aos níveis aumentados de cálcio no citosol, a quinase de cadeia leve

da miosina é ativada, resultando na contração do anel apical de actina. Essa contração pode levar a uma leve abertura do espaço paracelular provocada pela tensão no citoesqueleto associado às zonas de oclusão (*tight-junctions*), com conseqüente aumento da absorção de moléculas maiores (Daugherty and Mrsny, 1999). O mecanismo de transporte paracelular encontra-se ilustrado na figura 5.

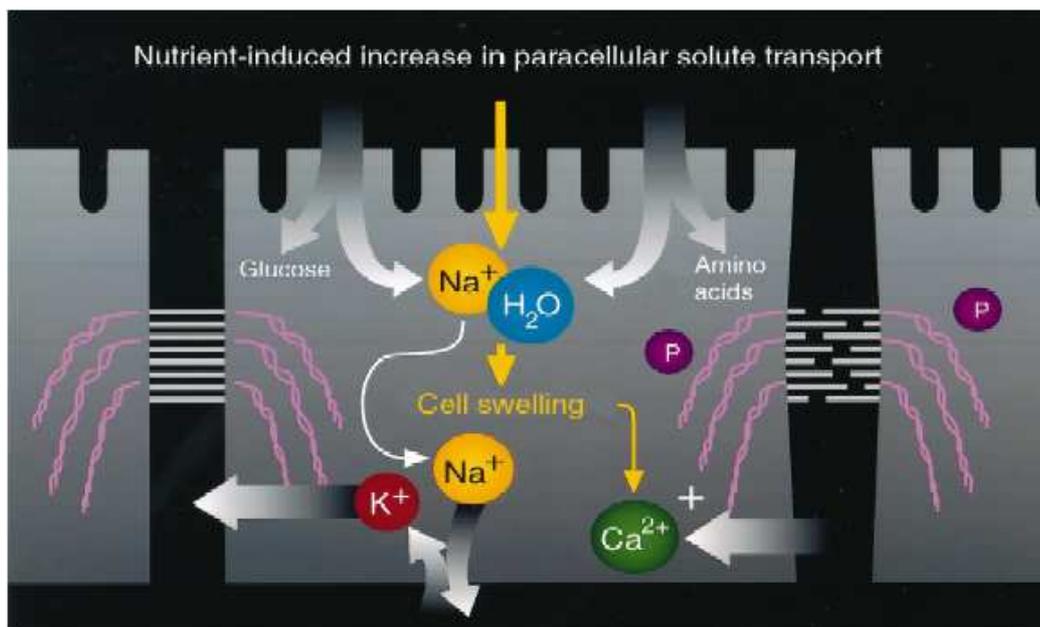


Figura 05: Mecanismo do transporte paracelular. A figura ilustra o aumento do influxo de nutrientes nas células intestinais pela via paracelular. Adaptado de *Daugherty & Mrsny, PSTT, 2:7:281-287,1999*.

As primeiras informações sobre a absorção, distribuição e excreção do BBI foram obtidas através de estudos com animais, utilizando BBI de soja marcado com I^{125} (BBI- I^{125}). Esses estudos demonstraram que 1 a 2% do BBI- I^{125} ingerido pode ser detectado em quase todo o organismo após 3 horas da sua administração. Os níveis mais elevados de radioatividade foram encontrados no conteúdo luminal obtido do estômago, intestino delgado e cólon (Billings *et. al.*, 1992).

Vários estudos foram realizados a fim de estimar a relação entre a dose biodistribuída e o potencial anti-tumoral do BBI. St. Clair e colaboradores (1990) verificaram que aproximadamente 0,1% do BBI adicionado às dietas de camundongos foram suficientes para inibir a indução de câncer hepático por 1,2-dimetilhidrazina

(DMH). A partir da quantidade de BBI ingerida pelos camundongos, foi demonstrado que cerca de 5 µg de BBI atingia o fígado desses animais diariamente. Experimentos realizados por Yavelow e colaboradores (1985) demonstraram que quantidades de BBI equivalentes àquela encontrada no fígado dos camundongos foram capazes de prevenir a transformação maligna de células *in vitro*, sugerindo que a quantidade de BBI biodistribuída após a ingestão de dietas suplementadas com esse inibidor é capaz de suprimir o câncer.

1.7. Mecanismos de ação anti-tumoral dos inibidores Bowman-Birk

Embora os mecanismos pelos quais os BBI exercem suas funções anti-carcinogênicas ainda não sejam completamente conhecidos, várias hipóteses tem sido discutidas. Coburn e colaboradores em 1981 sugeriram que os BBI são capazes de suprimir a carcinogênese através da prevenção das modificações celulares induzidas por radicais livres. O papel dos radicais livres no desenvolvimento do câncer ainda é obscuro, mas sabe-se que os inibidores de proteases são capazes de inibir leucócitos polimorfonucleares (PNM) bem como a liberação de espécies reativas de oxigênio por essas células (Frenkel *et al.*, 1987), contribuindo assim para a prevenção de danos oxidativos ao DNA.

Outros estudos demonstraram a capacidade dos BBI na prevenção dos processos angiogênicos necessários para a progressão tumoral. Através da inibição de serino-proteases, os BBI impedem a ativação de outras proteases envolvidas na degradação da membrana basal e matriz extracelular. Entre as enzimas não ativadas estão as metalo-proteases, que são secretadas sob a forma de zimogênio e necessitam da ação de serino-proteases para assumirem as formas ativas. O impedimento da ativação das cascatas de proteases causado pela ação dos BBI, além de prevenir a angiogênese também pode dificultar o processo metastático (Losso, 2008)

Recentemente o efeito quimiopreventivo dos BBI foi também associado com a inibição do proteassoma (Chen *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2007) um importante complexo proteolítico regulador de substratos protéicos intracelulares (Voutsadakis, 2008). O centro catalítico deste complexo denominado proteassoma 20S é formado por 28

subunidades agrupadas em duas famílias: as subunidades β das quais 3 são catalíticas e as α estruturais. As subunidades catalíticas possuem atividade do tipo caspase-símile, tripsina-símile e quimotripsina-símile (Kisselev *et al.*, 2006; Tanaka, 2009).

Chen e colaboradores (2005) utilizaram o BBI isolado do grão de soja com o objetivo de verificar se a atividade inibitória anti-quimotripsina do BBI poderia inibir a atividade quimotripsina-símile do proteassoma. Os autores demonstraram que o BBI é capaz de inibir especificamente a atividade quimotripsina-símile proteassomal *in vitro* e *in vivo* em células MCF7 isoladas de câncer de mama. Foi ainda demonstrado que tal inibição está associada ao acúmulo de substratos ubiquitinados e com uma diminuição nos níveis de ciclinas regulatórias do ciclo celular. Esse estudo sugere que a inibição da atividade do proteassoma pelo BBI poderia contribuir para seu efeito preventivo no câncer.

Evidências adicionais da interação BBI e proteassoma foram descritas por Saito e colaboradores (2007), os quais demonstraram que o BBI suprimiu a atividade quimotripsina-símile do proteassoma em células de osteosarcoma. De maneira específica o BBI inibiu a degradação da conexina 43 pelo sistema ubiquitina-proteassoma neste modelo tumoral. Sugere-se que o efeito anti-proliferativo observado seja devido à atuação da conexina como proteína supressora de tumor através da manutenção do controle homeostático em organismos multicelulares via junções GAP.

2. Justificativa e Objetivos

2. Justificativa e Objetivos

2.1. Justificativa

Embora vários trabalhos produzidos na década de 80 tenham apontado o BBI como molécula responsável pelo excelente efeito protetor do câncer induzido quimicamente, grande parte dos trabalhos utilizaram enriquecidos de soja (BBIC). Essas preparações possuem outras substâncias, também apontadas como quimiopreventivas. A lunasina, proteína identificada nesses concentrados, foi considerada como um dos principais componentes responsáveis da atividade anti-carcinogênica do BBIC. Diante disso, torna-se imprescindível o uso de preparações purificadas dos componentes presentes nesses enriquecidos para o tratamento de animais submetidos ao teste de prevenção do câncer, com o objetivo de esclarecer a real contribuição de cada uma dessas substâncias no efeito final. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos de purificação em escala preparativa é essencial para a execução de experimentos conclusivos nessa área.

Considerando a importância do BBI como fator de prevenção de câncer e a sua presença em diferentes tipos de dietas, torna-se necessário a quantificação do mesmo em diversos alimentos. A metodologia disponível na literatura para a quantificação de BBI em alimentos baseia-se na identificação imunoenzimática. Esses ensaios não discriminam as moléculas ativas daquelas que foram desnaturadas durante os processamentos da indústria alimentícia. Portanto, para se obter valores reais da concentração de BBI dotado de atividade é necessário o desenvolvimento de métodos que quantifiquem corretamente esse fator no seu estado nativo.

Poucos estudos descrevem o potencial imunogênico desse grupo de inibidores, amplamente distribuídos entre vegetais. De acordo com Sreerama e Gowda (1997), fragmentos do BBI de *Dolichos biflorus* apresentam determinantes antigênicos distribuídos nas cabeças inibitórias dessa molécula. O potencial imunogênico das porções ativas do BBI pode induzir a produção de anticorpos inibidores da sua atividade. Assim, estudos que visam obter informações sobre a indução de anticorpos

anti-BBI decorrentes da administração do BBI pela via oral forneceriam evidências para compreensão dos mecanismos de ação e estabelecimento de um regime ideal de dose.

2.2. Objetivos gerais

Desenvolver métodos originais de purificação de inibidores Bowman-Birk empregando processos preparativos. Quantificar esse inibidor em alimentos e verificar a variação do potencial imunogênico do BBI de *Glycine max* e *Macrotyloma axillare*

2.3. Objetivos específicos

- A) Desenvolver metodologia de purificação para obtenção preparativa de inibidores Bowman-Birk, presentes em sementes de leguminosas;
- B) Realizar análise comparativa entre as preparações de BBI obtidas segundo a metodologia proposta nesse trabalho e pelos métodos tradicionais;
- C) Desenvolver métodos para quantificação de BBI em alimentos;
- D) Quantificar BBI em alimentos derivados de soja;
- E) Obtenção de anti-soros específicos para detecção do BBI de soja;
- F) Avaliação do potencial imunogênico do BBI de *Glycine max* e *Macrotyloma axillare* pelo tratamento de animais com ração suplementada com esses inibidores.

3. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção do extrato enriquecido de soja (BBIC) através de método tradicional

Os extratos concentrados de BBI foram obtidos conforme a metodologia proposta por Yavelow e colaboradores (1985). Sementes de soja *Glycine max* trituradas em liquidificador foram delipidadas com 10 volumes de acetona P.A. As proteínas foram extraídas com 10 volumes de etanol 60% a 55°C com agitação constante por 1 hora. O material extraído foi filtrado em gaze, centrifugado a 4724 xg por 30 minutos e acidificado com HCl (pH 5,3). Posteriormente, o produto acidificado foi precipitado com 2 volumes de acetona P.A. e centrifugado a 4724 xg por 30 minutos. O precipitado resultante foi ressuspensionado em água destilada.

3.2. Métodos de obtenção do BBI das sementes de soja

3.2.1. Delineamento dos métodos de obtenção do BBI das sementes de soja

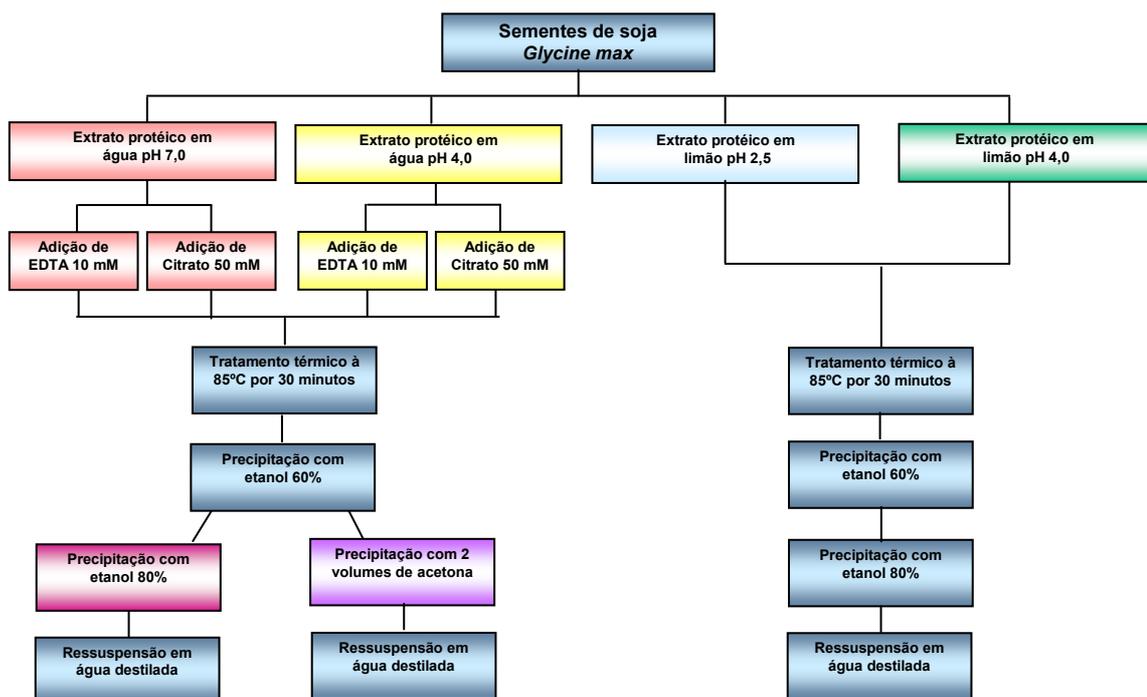


Figura 06: Fluxograma dos métodos de obtenção do BBI das sementes de soja

3.2.2. Obtenção do extrato protéico (EP)

Com o intuito de obter um extrato protéico de soja rico em inibidores de proteases foram propostos 4 protocolos distintos de extração. No protocolo 1, a extração protéica das sementes trituradas foi realizada a partir de uma suspensão a 30% p/v em H₂O pH 7,0. Para o protocolo 2, a extração protéica foi realizada utilizando-se H₂O pH 4,0 (correção do pH com CH₃COOH). Nos demais protocolos de extração foram utilizados sucos naturais de limão. Esses sucos foram empregados em pH 2,5 e pH 4,0 (pH modificado com NaHCO₃). Todas as preparações foram mantidas sob agitação por 12 horas a 4°C. Após o período de extração, as suspensões foram filtradas em gaze e submetidas à centrifugação a 4724 xg por 30 minutos para remoção de fibras insolúveis.

3.2.3. Teste de estabilidade térmica dos inibidores

Os extratos protéicos obtidos das sementes de soja foram submetidos a um tratamento térmico na presença ou ausência de diferentes produtos quelantes de metais com o objetivo de avaliar a estabilidade dos inibidores de proteases na presença destas substâncias. Aliquotas de 5 mL de cada um dos extratos foram retiradas e colocadas em tubos Falcon de 15 mL. Para as amostras tratadas com agentes quelantes, os extratos obtidos com água pH 4,0 foram acrescidos de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) ou citrato de sódio, nas concentrações finais de 10 mM e 50 mM, respectivamente. Todos os tubos contendo os extratos foram submetidos ao banho-maria a 85°C. Aliquotas de cada um dos extratos foram retiradas nos tempos de 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 150 min e imediatamente resfriadas em banho de gelo por 15 minutos. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 10000 x g para a remoção das proteínas precipitadas. Os sobrenadantes foram armazenados à 4°C para posterior análise de atividades inibitórias de proteases e dosagem de proteínas.

3.2.4. Precipitação por tratamento térmico do extrato protéico

Os extratos protéicos de soja obtidos em pH 4,0 foram submetidos a um tratamento térmico à 85°C na presença de EDTA ou citrato de sódio, nas concentrações finais de 10 mM e 50 mM, respectivamente. Não foi necessário adicionar substâncias quelantes de íons metálicos aos extratos obtidos com suco natural de limão, uma vez que esse suco possui uma grande quantidade de citrato em sua composição. Todos os extratos foram submetidos ao banho-maria a 85°C por 30 minutos. Os extratos foram resfriados em banho de gelo por 15 minutos e posteriormente centrifugados a 4724 xg por 30 minutos. Os sobrenadantes foram denominados extratos protéicos tratados termicamente (EPTT), e precipitados utilizando etanol e acetona ou apenas etanol.

3.2.5. Precipitação por etanol e acetona a frio

O EPTT foi acrescido de etanol a -20°C para uma concentração final de 60% e mantido em repouso em banho de gelo por 1 hora. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 4724 xg por 30 minutos. O sobrenadante foi precipitado com 2 volumes de acetona P.A. a -20°C e centrifugado a 4724 xg por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em água destilada e armazenado para posterior identificação e caracterização.

3.2.6. Precipitação por etanol a frio

Volumes de etanol P.A. a -20°C foram adicionados ao EBTT até atingir concentração final de 60%. A suspensão foi mantida em banho de gelo por 1 hora em repouso e, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 4724 xg. Ao sobrenadante foi acrescido etanol P.A. a -20°C até atingir concentração final de 80%. A suspensão foi mantida em repouso em banho de gelo por 1 hora. O material decantado foi ressuspenso em água destilada e armazenado para posterior identificação e caracterização. Os volumes de etanol necessários para a precipitação de cada fração foram calculados segundo a equação:

$$V(ml) = \frac{1000(C_2 - C_1)}{100 - C_2}; \text{ onde:}$$

V, é igual ao volume de etanol a ser adicionado à solução; C1 concentração inicial da solução; C2 concentração final.

3.3. Caracterização do BBI por eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras provenientes dos procedimentos utilizados para purificação do inibidor foram identificadas e caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada segundo o método descrito Laemmli (1970), utilizando géis de separação a 15% e géis de concentração a 5%, em condições desnaturantes.

Os géis foram preparados com os seguintes reagentes:

- Solução tampão Tris 1,5M pH 8,8 no gel de separação e solução tampão Tris 0,5M pH 6,8 no gel de concentração;
- Solução de acrilamida 30% p/v + bis-acrilamida 1% p/v;
- Solução de SDS a 10% p/v;
- Solução de persulfato de amônio a 10% (preparo recente);
- N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED);
- Água milli-Q q.s.p 10 mL.

As amostras foram reduzidas com ditioneitol (DTT) a 10 mM por 30 minutos à 65°C no bloco térmico e posteriormente alquiladas com iodoacetamida a 40 mM por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Após redução e alquilação, as amostras foram diluídas (1:2) em tampão contendo Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4% p/v e glicerol 20% v/v, azul de bromofenol 0,002% p/v, e submetidas ao banho de água fervente por 5 minutos para desnaturação total das proteínas. Uma mistura de isoformas da proteína Conavalina A (ConA) de massas moleculares 30, 28, 23, 17, e 13 kDa foi utilizada como padrão de massa molecular.

O tampão Tris-HCl 25 mM contendo glicina 0,19 M e SDS 0,1% p/v foi utilizado como tampão de corrida. A eletroforese foi realizada sob uma corrente elétrica constante de 20 mA por gel, durante aproximadamente 90 minutos. Após o término da eletroforese, a presença das bandas protéicas foi detectada com a imersão dos géis em solução de *Coomassie Blue* R-250 0,025% em metanol 40% e 7% de ácido acético sob agitação branda por 2 horas. Em seguida os géis foram descorados em solução 40% metanol e 7% ácido acético.

3.4. Cromatografia de fase reversa

A amostra da preparação de BBI obtida com emprego de citrato e precipitação com etanol foi submetida à cromatografia de fase reversa para análise de pureza e comparada com amostra de BBI obtida pelo método de purificação tradicional. As cromatografias foram realizadas em coluna C18 (4,6 mm x 250 mm) (Shim-pack CLD-ODS (M)-Shimadzu[®]), em sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) da Shimadzu[®]. A coluna foi previamente equilibrada com ácido trifluoracético (TFA) 0,1% e a fração ligada eluída através de um gradiente de acetonitrila (ACN) de 0 a 100% e TFA 0,1% v/v durante 30 minutos com um fluxo de 1 mL/min. Aos 5 minutos de eluição o gradiente atingiu a concentração de 33 % de acetonitrila, permanecendo constante até 15 minutos. A concentração de acetonitrila atingiu 100% em 20 minutos de eluição e retornou a 0% em 25 minutos. A eluição foi monitorada a 280 nm e as frações coletadas que apresentaram atividade inibitória anti-tripsina foram analisadas e submetidas novamente à cromatografia de fase reversa.

Outra condição cromatográfica foi utilizada para a análise da pureza da preparação e purificação do BBI: Fase estacionária: coluna C18 (4,6 mm x 250 mm) (Shim-pack CLD-ODS (M)-Shimadzu[®]); Fase móvel: A: H₂O + TFA 0,1% ; B: ACN + TFA 0,1%; eluição por gradiente: 0 a 15% de B em 25 minutos, permanecendo nessa concentração até 20 minutos de eluição. Decorrido esse tempo, a concentração de ACN atingiu 20% em 25 minutos e 30% em 30 minutos de eluição. A concentração de ACN atingiu 100% em 35 minutos de eluição e retornou a 0% em 40 minutos.

3.5. Caracterização do BBI por espectrometria de massa

As frações coletadas da cromatografia de fase reversa com atividade inibitória antitripsina foram analisadas por espectrometria de massa utilizando-se o espectrômetro LCMS-IT-TOF (Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight) que opera por ionização do tipo *electrospray* (Shimadzu®). O equipamento foi calibrado utilizando trifluoroacetato de sódio. A voltagem capilar foi de 4500 V no modo positivo de ionização, com tempo de acumulação de 10 ms. As amostras foram diluídas em solução de 0.1% de ácido fórmico e aplicadas através de injeção direta. Os dados foram analisados usando o *software LCMSsolution*.

3.6. Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Lowry e colaboradores (1951). A proteína utilizada como padrão de referência foi a soroalbumina bovina (BSA) *Merck*, da qual foram preparadas soluções de 250 a 1000 µg/mL para obtenção de uma curva padrão. A leitura da absorvância das amostras testes foi realizada em espectrofotômetro a 660 nm.

3.7. Ensaio enzimáticos

3.7.1. Atividade inibitória anti-tripsina e anti-quimotripsina bovina

A determinação da atividade anti-tripsina foi realizada de acordo com Kumar *et al.* (2002). O substrato utilizado foi o cloridrato de N- α -benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida ($_{DL}$ -BApNA), o qual foi preparado dissolvendo-se 196 mg do composto em 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) para uma concentração final de 9×10^{-2} M. Esta solução foi mantida no congelador como solução estoque e diluída no momento do uso com Tris-HCl 0,1M contendo $CaCl_2$ 20 mM pH 8,1 para a concentração de 9×10^{-4} M.

Para a obtenção de um título que inibisse entre 40 e 60% da atividade da tripsina, foram realizadas diluições seriadas do inibidor. A cada tubo de ensaio foram adicionados 200 μL de DL-BApNA , 20 μL de tripsina a uma concentração de 0,05 mg/mL e 20 μL do inibidor. Nos tubos brancos foram adicionados 200 μL de substrato e 40 μL de água, enquanto que os tubos controles de atividade enzimática continham 200 μL de substrato, 20 μL de enzima e 20 μL de água.

Os tubos de reação foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 37°C por aproximadamente 40 minutos. A reação foi interrompida com 40 μL de ácido acético 60% v/v seguido da adição de 250 μL de água destilada. A quantificação da atividade inibitória foi realizada pela medida da absorvância a 410 nm em espectrofotômetro. Os ensaios para a determinação da atividade anti-quimotripsina foram realizados essencialmente como descrito acima, entretanto o substrato utilizado foi o cloridrato de N- α -benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida (L-BTpNA).

3.8. Tabelas de purificação

As tabelas de purificação do BBI das sementes de soja foram construídas a partir de dados sobre volumes, concentrações de proteínas e atividade inibitória das amostras resultantes cada uma das etapas de purificação. Esses dados permitiram o cálculo dos seguintes parâmetros:

- Massa Total de Proteína: concentração de proteína multiplicada pelo volume;
- Atividade Inibitória: fator de diluição de uma solução de amostra que inibiu entre 40 e 60% as enzimas, multiplicado pela porcentagem de inibição* obtida;
- Atividade Total: atividade da alíquota multiplicada pelo volume;
- Atividade Específica: atividade total dividida pela massa total de proteína;
- Rendimento: atividade total de uma etapa dividida pela atividade total do extrato bruto, multiplicado por 100;
- Enriquecimento: atividade específica de uma etapa dividida pela atividade específica do extrato bruto.

* $1 - (\text{AEI}/\text{AE}) \times 100$, onde:

AEI = Absorvância a 410nm do ensaio de inibição da atividade enzimática (inibidor + enzima + substrato)

AE = Absorvância a 410nm do ensaio de atividade enzimática controle (enzima + substrato)

3.9. Análise comparativa das seqüências de BBI extraídos de duas leguminosas

As seqüências primárias de BBI de *Macrotyloma axillare* e *Glycine max* foram recuperadas do banco de dados de proteínas disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. As seqüências foram alinhadas com a utilização do programa ClustalW disponível em <http://align.genome.jp> para verificação da homologia entre elas.

3.10. Obtenção de anti-soros específicos para detecção do BBI

A produção de anti-soros específicos para detecção do BBI foi realizada a partir de imunização via intraperitoneal de fêmeas de camundongos *Swiss*, com idade entre 4 e 6 semanas. Os camundongos foram divididos em 3 grupos. Um dos grupos de animais receberam 50 µg de BBI de *Glycine max* purificado, na forma de emulsão com o adjuvante hidróxido de alumínio a 10% na proporção de 1 parte de BBI para 10 partes de adjuvante. Os demais grupos de camundongos foram imunizados com 50 µg de BBI de *Macrotyloma axillare* ou com 50 µg de peptídeos sintéticos anti-quimotripsina SCTFSLPPQCYGGGGG (correspondente à cabeça de inibição de quimotripsina do BBI), também na forma de emulsão com o mesmo adjuvante. A imunização de todos os camundongos se repetiu a cada 15 dias em um total de 3 injeções. Os soros policlonais produzidos contra o BBI de soja, o BBI de *Macrotyloma axillare* e o peptídeo anti-quimotripsina foram testados através de ensaios imunoenzimáticos.

Os inibidores Bowman-Birk das sementes de *Macrotyloma axillare* (BBIM) utilizados para imunização dos camundongos foram obtidos segundo Santos (2006). O processo de purificação do BBIM foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do nosso

Laboratório e encontra-se em fase de publicação. A síntese dos peptídeos anti-quimotripsina realizada segundo Merrifield (1963) também foi desenvolvida pelos pesquisadores do nosso laboratório em colaboração com o Laboratório de Imuno-histoquímica de Proteínas da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais). Já os BBI de soja, foram obtidos segundo a metodologia descrita nesse trabalho, onde se utilizou tratamento térmico na presença de citrato de sódio e precipitações com etanol.

3.11. Dot blot

Membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,2 μm , Invitrogen[®], foram utilizadas para transferência de 10 μg de BBI de soja purificado ou 10 μg da mesma amostra reduzida com DTT e alquilada com iodoacetamida. As membranas foram bloqueadas com solução Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tween-20 0,3% e leite em pó desnatado 5%. Posteriormente, essas membranas foram lavadas com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e incubadas em tampão de imunoblotting (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tween-20 0,013% e leite em pó desnatado 5%) durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados soros de camundongos contendo anticorpos policlonais anti-BBI ou anti-peptídeo SCTFSLPPQCYGGGGG (item 3.10), na diluição de 1:500. Após 3 horas de incubação, as membranas foram lavadas com solução Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e novamente incubadas por 2 horas com tampão de imunoblotting contendo anticorpos secundários anti-IgG de camundongos, marcado com fosfatase alcalina na diluição de 1:1000 (Sigma Chemical[®]). As membranas foram lavadas com Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e reveladas com solução de NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato).

3.12. Western blot

A técnica de Western blot foi realizada para a detecção de BBI purificado e BBI presente em alimentos derivados da soja de acordo como descrito por Towbin e colaboradores (1979). Os anticorpos primários policlonais anti-BBI ou anti-peptídeo

foram produzidos em nosso laboratório, conforme descrito no item 3.10. Aproximadamente 20 µg das amostras reduzidas e alquiladas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Após eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para a membrana de PVDF. A transferência foi realizada a 200 mA em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20% e SDS 10% sob refrigeração por duas horas. Após a transferência, a membrana foi mantida sob agitação por 12 horas a 4°C em tampão de bloqueio (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tween-20 0,3% e leite em pó desnatado 5%) e posteriormente lavada 3 vezes com Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Logo após essas lavagens a membrana foi incubada com tampão de imunoblotting (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tween-20 0,013% e leite em pó desnatado 5%) sob agitação durante 30 minutos. Decorrido esse tempo adicionou-se ao tampão de imunoblotting anticorpos primários anti-BBI ou anti-peptídeo na proporção 1:500 os quais reagiram durante 3 horas, sob agitação. A incubação das membranas com anticorpos secundários e revelação das bandas reativas foram realizadas como descrito anteriormente.

3.13. Quantificação de BBI em alimentos através de ensaios enzimáticos

Para quantificar o BBI em alimentos foi realizada inicialmente a construção de uma curva padrão que relacionou a concentração de BBI com a atividade anti-tripsina e anti-quimotripsina. A concentração de BBI de soja purificado foi identificada segundo Lowry (1951). A partir de uma solução contendo 8,56 mg/mL de BBI foram realizadas diluições seriadas até a diluição de 1:256. Alíquotas de 3 mL de cada uma das diluições foram submetidas ao banho-maria a 85°C por 30 minutos, em meio ácido. Em seguida, as soluções foram resfriadas em banho de gelo por 15 minutos e centrifugadas a 4724 xg por 30 minutos. Amostras dos sobrenadantes foram retiradas e armazenadas para dosagem de proteínas e ensaios enzimáticos. Para a construção da curva padrão, os valores das concentrações de BBI foram plotados no eixo das abscissas e as % das atividades inibitórias específicas plotadas no eixo das ordenadas.

O leite de soja foi o alimento escolhido para a realização do ensaio de quantificação do BBI. Amostras de 1 mL desse alimento foram colocadas em tubos de 1,5 mL para microcentrífugas e acrescidas de concentrações diferentes de BBI

purificado. Todos os tubos contendo o alimento foram tratados termicamente como descrito acima. Os dados obtidos nesse ensaio foram utilizados para plotar um gráfico comparativo da estabilidade térmica do BBI puro e do BBI presente em alimentos. As concentrações de BBI, presentes nos alimentos derivados de soja, foram então determinadas de acordo com as equações de retas obtidas através da análise dos gráficos mencionados acima. Os alimentos analisados pertenciam às marcas Ades[®], Leve[®], Sollys[®], Soyvida[®] e Vitao[®].

3.14. Tratamento de animais com alimentos suplementados com BBI

Fêmeas de camundongos *Swiss* (15 animais), com idade entre 4 e 6 semanas, foram divididas em 3 grupos, os quais receberam rações *in natura* suplementadas ou não com 0,1% de BBI de soja *Glycine max* (BBIS) ou de BBI de *Macrotyloma axillare* (BBIM). Os inibidores Bowman-Birk foram acrescentados às rações na forma de extratos enriquecidos de BBI. As preparações de BBI de soja foram obtidas segundo a metodologia proposta nesse trabalho, que utilizou tratamento térmico na presença de citrato e precipitações com etanol. Já as preparações de BBIM foram obtidas segundo a metodologia descrita por Santos (2006). As rações foram oferecidas *ad libitum* aos animais durante 30 dias e a quantidade consumida foi obtida através da diferença entre o peso da ração oferecida e o peso da ração após 2 dias de consumo. O peso dos animais foi verificado semanalmente, durante o período de duração do experimento.

Os soros dos animais tratados com rações suplementadas com BBI de *Glycine max* e de *Macrotyloma axillare* foram utilizados para a avaliação do potencial imunogênico desses inibidores.

3.15. Análise estatística

As análises estatísticas utilizadas nesse trabalho foram realizadas através do *software Prisma*, utilizando-se ANOVA para análise de variância e o teste de Tukey, para a comparação de médias.

4. Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Obtenção e análise do BBIC descrito na literatura

O interesse pelo uso de produtos da soja como agentes preventivos do câncer surgiu de estudos epidemiológicos que demonstraram a baixa incidência de câncer em populações que apresentavam alto consumo de soja (Armstrong *et al.*, 2000). A leguminosa *Glycine max* e seus derivados possuem uma variedade de compostos fitoquímicos relacionados aos efeitos anti-carcinogênicos (Messina and Loprinzi 2001), os quais incluem: inibidores de proteases (Losso, 2008), isoflavonas (Messina and Redmond, 2006), saponinas (Oh and Sung, 2001), peptídeos bioativos (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2009), ácidos fílicos e β -sitosteróis (Armstrong *et al.*, 2000). Os inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk foram considerados por Kennedy (1998) os mais potentes agentes preventivos da carcinogênese encontrados na soja.

Com o objetivo de avaliar a capacidade do BBI de inibir processos tumorigênicos *in vivo*, vários trabalhos utilizaram uma preparação enriquecida de BBI (Billings *et al.*, 1992; Malkowicz *et al.*, 2001), conhecida como BBIC. O emprego desses extratos enriquecidos em experimentos com animais e humanos deve-se ao elevado custo para a obtenção do BBI puro. A metodologia clássica de purificação com elevado grau de pureza do BBI, descrita por Odani e Ikenaka (1977), apresenta baixo rendimento e pode ser considerada inviável para ser empregada em longos regimes de tratamentos de animais em estudos de prevenção do câncer induzido quimicamente.

A atividade quimiopreventiva contra diferentes tipos de cânceres induzidos por carcinógenos químicos e radiações tem sido relatada com a utilização de preparações de BBIC (Losso, 2008). Esta atividade foi atribuída apenas à presença do BBI, desconsiderando a existência de outras possíveis substâncias anti-carcinogênicas presentes nos enriquecidos de soja. Diversos compostos quimiopreventivos já foram identificados nas preparações de BBIC, entre eles estão a lunasina, outros inibidores de tripsina, isoflavonas e saponinas (Hsieh *et al.*, 2010; Lippman and Matrisian 2000; Zimacheva and Mosolov, 1995).

O perfil eletroforético do BBIC (Figura 7) obtido em nosso laboratório segundo metodologia descrita por Yavelow e colaboradores (1985), mostra o enriquecimento de proteínas com massa molecular aparente de 13 kDa, indicativas da presença de isoformas do BBI. Entretanto, foi possível também verificar nessa preparação a presença de proteínas com massas moleculares superiores. Por considerar o grau de pureza insatisfatório, nossa proposta baseou-se no desenvolvimento de métodos capazes de fornecer um enriquecido de BBI de soja de maior homogeneidade.

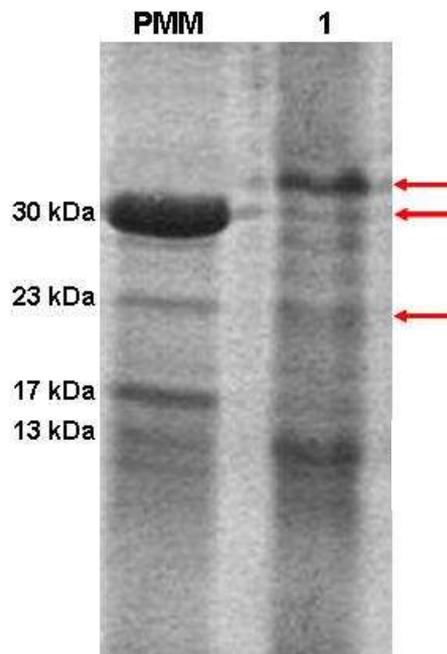


Figura 07: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) do BBIC obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). Legenda: PMM, Padrão de massa molecular (ConA); Linha 1: BBIC. As setas vermelhas indicam a presença de proteínas com peso molecular próximos a 23 e 30 kDa.

4.2. Purificação e caracterização do BBI de soja

4.2.1. Obtenção do extrato protéico

As extrações protéicas das sementes de soja foram realizadas em pHs neutro e ácido (pH 4) tendo em vista a maior estabilidade térmica observada para os inibidores de proteases nestas condições. Segundo Osman e colaboradores (2002), as atividades

inibitórias do BBI purificado da soja é rapidamente perdida quando tratada à 100°C em pH alcalino.

De maneira similar ao perfil eletroforético do BBIC (Figura 7), os extratos protéicos da soja (Figura 8) também apresentaram proteínas com massas moleculares superiores a 13 kDa. O fato dos inibidores de proteases do tipo Kunitz e das lectinas serem amplamente distribuídas em sementes de soja, e apresentarem, massas moleculares em torno de 22 e 30 kDa (Sharon, 1993; Sharon and Lis, 1990; Song and Suh, 1998), sugere que estas moléculas constituem os principais contaminantes dos BBIC (setas vermelhas).

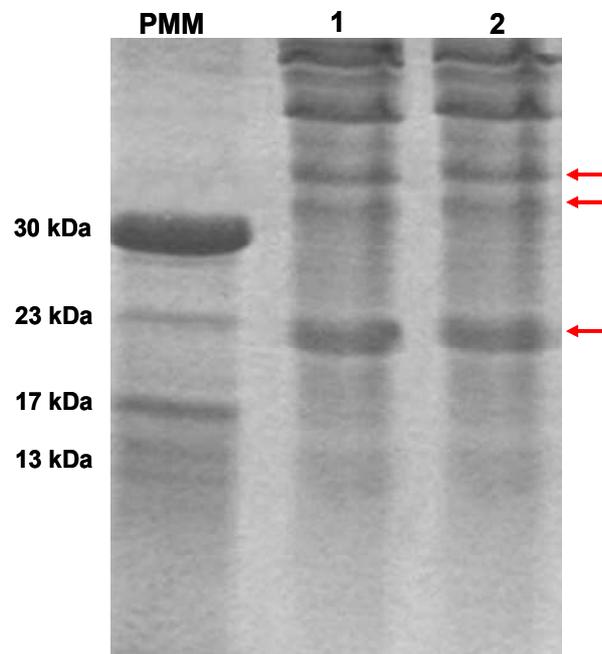


Figura 08: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) dos extratos protéicos da soja. Legenda: PPM, Padrão de massa molecular (ConA); Linha 1: Extrato protéico (pH 4,0); Linha 2: Extrato protéico (pH 7,0). As setas vermelhas indicam a presença de proteínas com peso molecular próximos a 23 e 30 kDa.

Os tratamentos térmicos, comumente utilizados para a purificação do BBI, são empregados para a inativação das lectinas e dos inibidores tipo kunitz presentes nas preparações (Antunes and Sgarbieri, 1980; Ojimekwe *et al.*, 1995; Sgarbieri and Whitaker, 1982). Entretanto, trabalhos realizados em nosso laboratório verificaram que esses tratamentos não são suficientes para remover as proteínas contaminantes da solução. Como as lectinas de leguminosas são dependentes de íons divalentes (Ca^{+2})

para a estabilização das suas estruturas (Sharon and Lis, 1990; Sharon, 1993), verificou-se a possibilidade de utilização de agentes quelantes de íons metálicos (EDTA ou citrato de sódio) durante os tratamentos térmicos. Espera-se que a remoção dos íons divalentes, através do uso desses agentes quelantes, torne essas moléculas mais susceptíveis à agregação e facilite a precipitação das mesmas.

4.2.2. Teste de estabilidade térmica e tratamento térmico

Estudos realizados por DiPietro e Liener (1989) verificaram a estabilidade térmica dos extratos de soja em temperaturas que variavam de 75°C a 95°C. Através desses estudos foi possível concluir que os inibidores tipo Bowman-Birk, presentes nesses extratos, tem sua atividade inibitória reduzida com o aumento da temperatura. Como não foram observadas grandes diferenças na estabilidade dos extratos tratados a 75°C e 85°C, por aproximadamente 100 minutos, o teste de estabilidade térmica realizado em nosso trabalho foi efetuado a 85°C.

Com o objetivo de definir o tempo de tratamento térmico para as diversas condições propostas, foram construídas curvas de estabilidade, relacionando as atividades residuais com o tempo de tratamento à 85°C (Figuras 9 e 10). Esses dados demonstraram que os extratos ácidos, tratados termicamente na presença de EDTA ou citrato de sódio, apresentaram maior estabilidade que àqueles aquecidos em pH neutro. Os agentes quelantes adicionados aos extratos ionizam-se formando espécies aniônicas que se ligam a íons metálicos presentes nas soluções (Jonas, 1995).

Notou-se que em todos os extratos, com exceção daquele obtido com pH neutro, a estabilização das atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina ocorreu entre 10 e 30 minutos de tratamento térmico. Considerando o nível de significância de 0,05, foi possível verificar pelo teste de Turkey que não existe diferença significativa entre as atividades residuais dos extratos ácidos entre 10 e 30 minutos de tratamento à 85°C em pH 4.

A redução inicial da atividade anti-tripsina dos extratos ácidos (aproximadamente 50%) e posterior estabilização, indica a existência de duas moléculas com propriedades térmicas distintas (figura 9). Tendo em vista que os KTI purificados

apresentam somente atividade anti-tripsina e que são mais termolábeis que os inibidores tipo Bowman-Birk (Sgarbieri and Whitaker, 1982), a alta redução da atividade anti-tripsina observada durante os primeiros 10 minutos de tratamento térmico foi atribuída à desnaturação desse inibidor. A manutenção de BBI ativo nos extratos ácidos pode ser verificada através da baixa redução da atividade anti-quimotripsina (cerca de 20%) durante 30 minutos de tratamento.

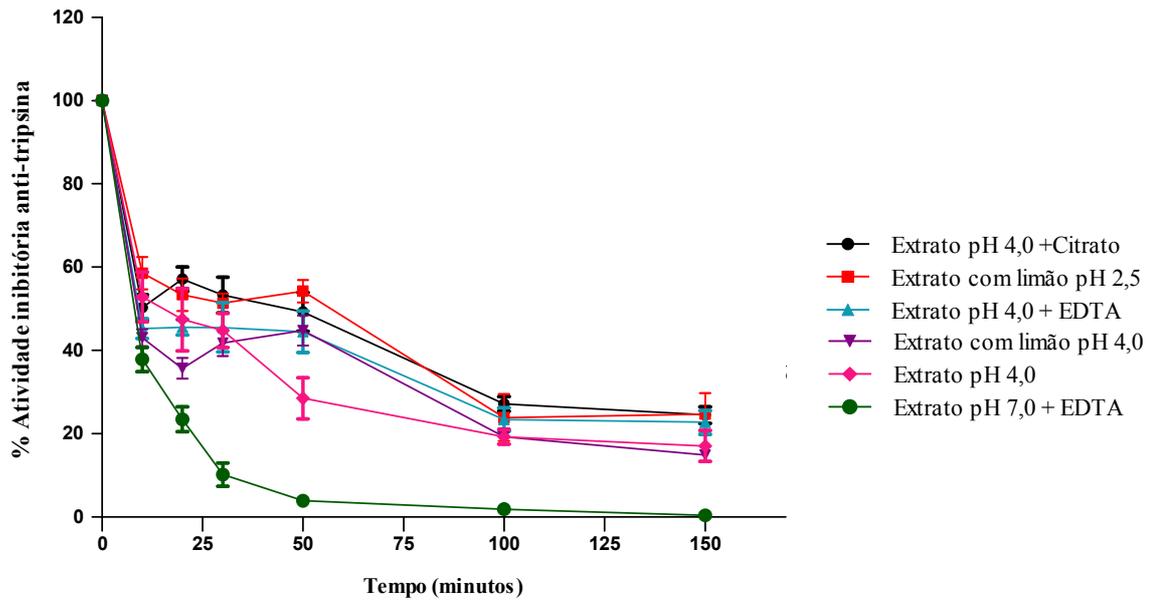


Figura 09: Gráfico da estabilidade térmica dos inibidores de tripsina presentes em extratos de soja. As barras de erros indicam o desvio padrão de três ensaios independentes.

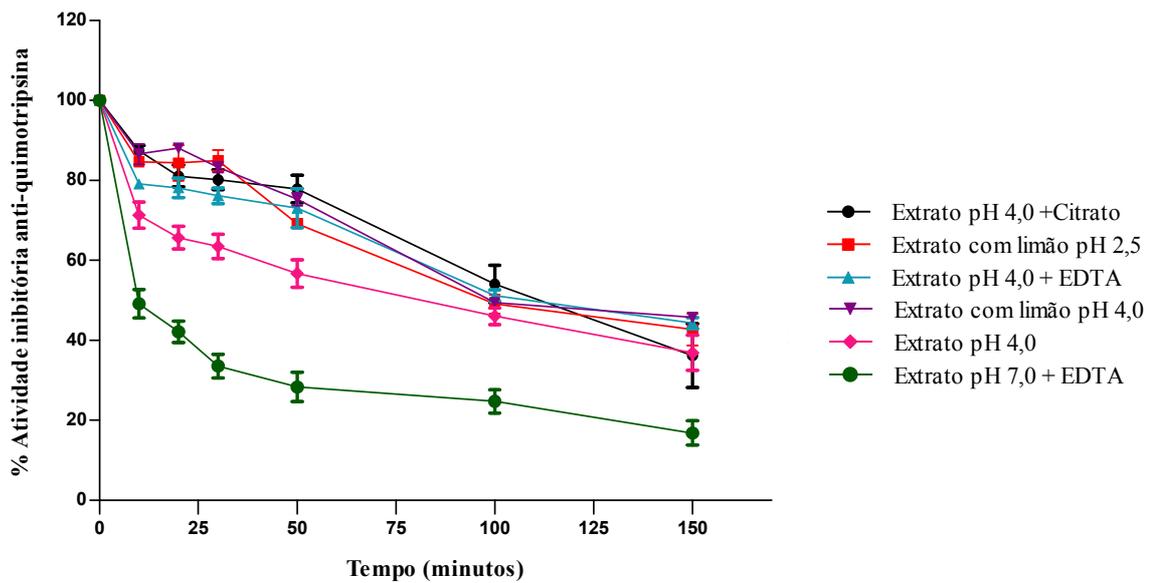


Figura 10: Gráfico da estabilidade térmica dos inibidores de quimotripsina presentes em extratos de soja. As barras de erros indicam o desvio padrão de três replicatas.

Visando a remoção de KTI e lectinas da amostra, com a mínima redução da atividade do BBI, considerou-se ideal o tempo de 30 minutos para o tratamento térmico à 85°C. As amostras submetidas a essa condição foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 11) a qual demonstrou que, mesmo reduzindo as atividades anti-tripsina dos extratos protéicos de soja, não ocorreu a total remoção de proteínas contaminantes com massas moleculares em torno de 22 e 30 kDa.

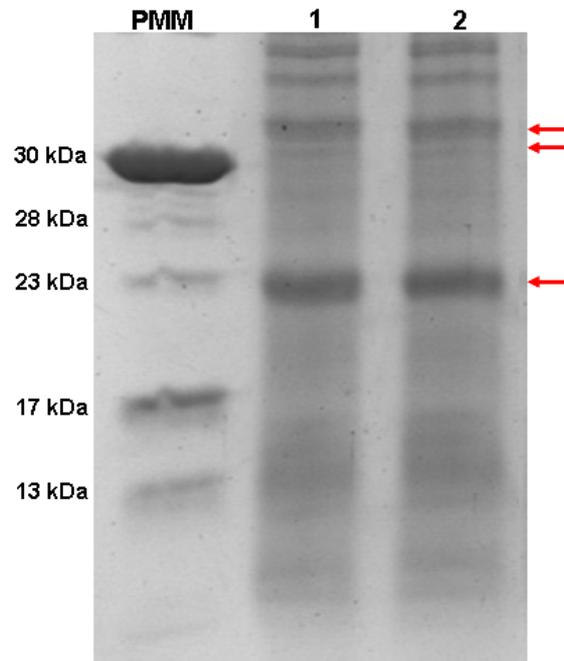


Figura 11: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) dos extratos protéicos de soja tratados termicamente à 85°C durante 30 minutos. Legenda: PPM, Padrão de massa molecular (ConA); Linha 1: Extrato protéico de soja pH 4,0 + EDTA; Linha 2: Extrato protéico de soja pH 4,0 + citrato de sódio. As setas vermelhas indicam a presença de proteínas com massa molecular em torno de 23 e 30 kDa.

4.2.3. Precipitação dos EPTT com etanol e/ou acetona

Nesta etapa foram utilizadas precipitações com solventes orgânicos, pois o tratamento térmico não foi suficiente para excluir as proteínas contaminantes dos extratos protéicos. Estudos prévios realizados em nosso laboratório determinaram que o emprego de etanol, na concentração de 60%, mostrou-se eficiente para a precipitação de lectinas nos extratos protéicos tratados termicamente (Santana, 2004). Desta forma, todas as amostras tratadas à 85°C foram submetidas a um processo de precipitação com

etanol a 60%. Posterior a este procedimento, etanol a 80% ou acetona P.A foram utilizados para a precipitação dos inibidores Bowman-Birk presentes em solução.

O resultado final das precipitações com solventes orgânicos foi analisado por SDS-PAGE (Figura 12). A análise do perfil eletroforético de cada uma das preparações, revelou que os métodos que utilizaram os agentes quelantes durante o tratamento térmico foram mais eficientes na remoção das proteínas contaminantes da preparação. As amostras não tratadas com quelantes apresentaram-se menos enriquecidas após tratamento térmico e precipitações com solventes orgânicos, sugerindo que a remoção dos íons divalentes das amostras tratadas não se limitou em facilitar apenas a precipitação de lectinas. A ação dos agentes quelantes sobre as demais proteínas, deve-se, provavelmente, à redução de solubilidade dessas moléculas.

As amostras submetidas à precipitação apenas com etanol, apresentaram-se, do ponto de vista eletroforético (Figura 12A), maior grau de pureza que aquelas precipitadas com acetona. A presença de proteínas com massas moleculares inferiores a 13 kDa, nas preparações submetidas à precipitação com acetona, deve-se provavelmente a maior eficiência desse solvente em precipitar moléculas de baixa massa molecular.

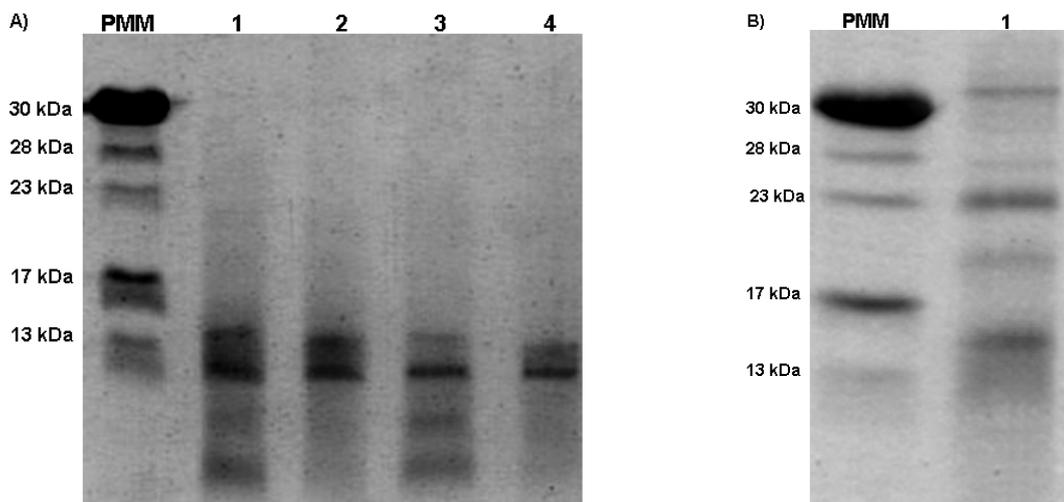


Figura 12: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) dos extratos protéicos de soja submetidos a precipitações com solventes orgânicos. A) Extratos protéicos de soja tratados termicamente na presença de agentes quelantes de íons metálicos. PPM: Padrão de massa molecular (ConA); Linha 1: Extrato protéico (pH 4,0) + EDTA precipitado com etanol 60% e acetona; Linha 2: Extrato protéico (pH 4,0) + EDTA precipitado com etanol 60% e 80%; Linha 3: Extrato protéico (pH 4,0) + citrato de sódio precipitado com etanol 60% e acetona; Linha 4: Extrato protéico (pH 4,0) + citrato de sódio precipitado com etanol 60% e 80%. **B) Extratos protéicos de soja tratados termicamente na ausência de agentes quelantes de íons metálicos.** PPM: Padrão de massa molecular (ConA); Linha 1: Extrato protéico tratado termicamente na ausência de quelantes de íons metálicos e precipitado com etanol 60% e 80%.

4.2.4. Método de obtenção de BBI de soja a partir de substâncias de origem natural

Com intuito de obter uma preparação de BBI sem a utilização de substâncias sintéticas, substituímos os agentes quelantes por sucos de limão em pH natural (2,5) e pH 4,0. O limão é uma fruta rica em ácido cítrico e 200 mL de seu suco concentrado possui aproximadamente 9,8g desse ácido (Penniston *et al.*, 2008).

Os extratos protéicos de soja obtidos com suco de limão também receberam tratamentos térmicos e foram submetidos a precipitações com etanol. As preparações resultantes desses processos apresentaram composição semelhante àquelas apresentadas anteriormente (Figura 13), sugerindo que o BBI pode ser purificado por meio de procedimentos típicos de um processamento de alimentos, onde se utiliza apenas produtos naturais.

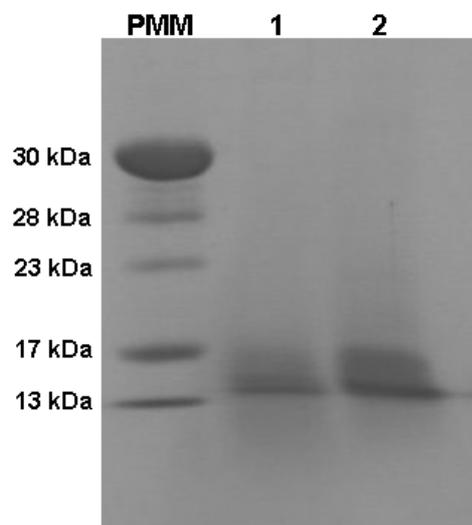


Figura 13: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) das preparações de BBI obtidas com suco de limão. PPM: Padrão de massa molecular (ConA); Linha 1: Preparação obtida com limão em pH 2,5; Linha 2: Preparação obtida com limão em pH 4,0.

4.2.5. Análises quantitativa e qualitativa dos diferentes métodos de preparação de BBI

Parâmetros de purificação foram utilizados para monitorar a quantidade e a qualidade das preparações de BBI ao longo dos diferentes protocolos de isolamento. A elaboração das tabelas de purificação foi baseada no monitoramento da inibição de hidrólise dos substratos específicos para tripsina e quimotripsina. Entretanto, apenas os dados referentes à inibição dessa última devem ser levados em consideração, uma vez que os extratos protéicos de soja possuem dois tipos de inibidores de tripsina (Kunitz e BBI). Os parâmetros de enriquecimento e rendimento foram compilados e mostrados através dos gráficos abaixo (Figuras 14 e 15). As tabelas de purificação com todos os parâmetros estão presentes no apêndice.

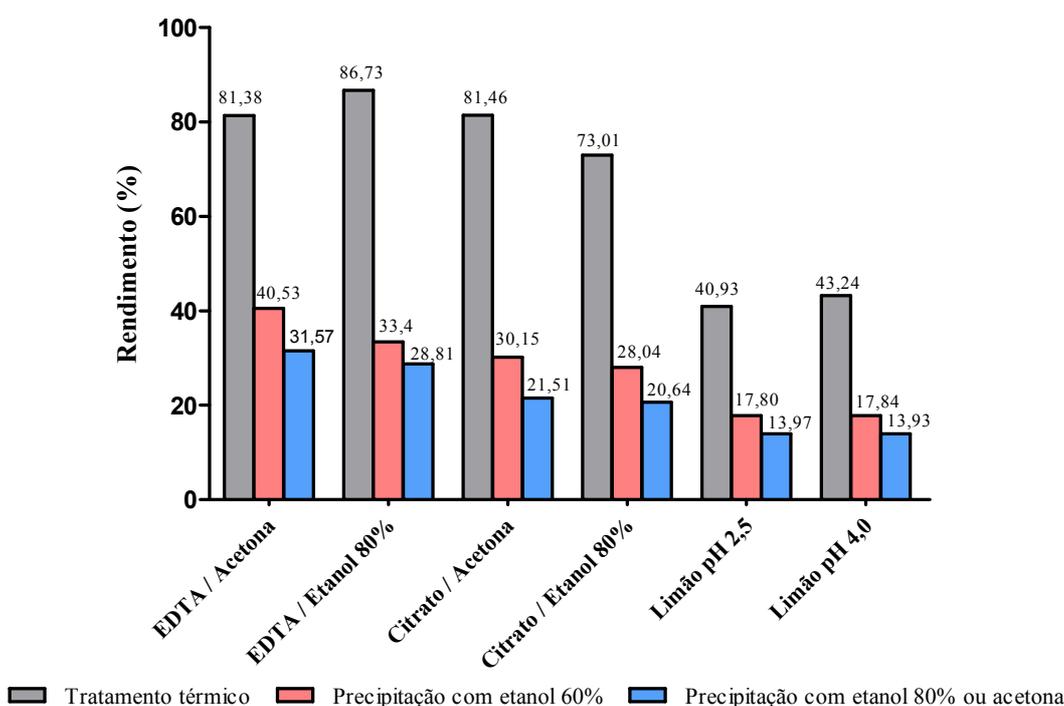


Figura 14: Gráfico do rendimento das preparações de BBI, considerando a inibição da hidrólise de L -BTpNA pela quimotripsina. EDTA/Acetona: extratos tratados termicamente na presença de EDTA e precipitados com etanol 60% e acetona; EDTA/Etanol 80%: extratos tratados termicamente na presença de EDTA e precipitados com etanol 60% e 80%; Citrato/Acetona: extratos tratados termicamente na presença de citrato de sódio e precipitados com etanol 60% e acetona; Citrato/Etanol 80%: extratos tratados termicamente na presença de citrato de sódio e precipitados com etanol 60% e 80%; Limão pH 2,5: extratos obtidos com suco de limão pH 2,5; Limão pH 4,0: extratos obtidos com suco de limão pH 4,0. Os dados dessa tabela representam médias de dois ensaios independentes.

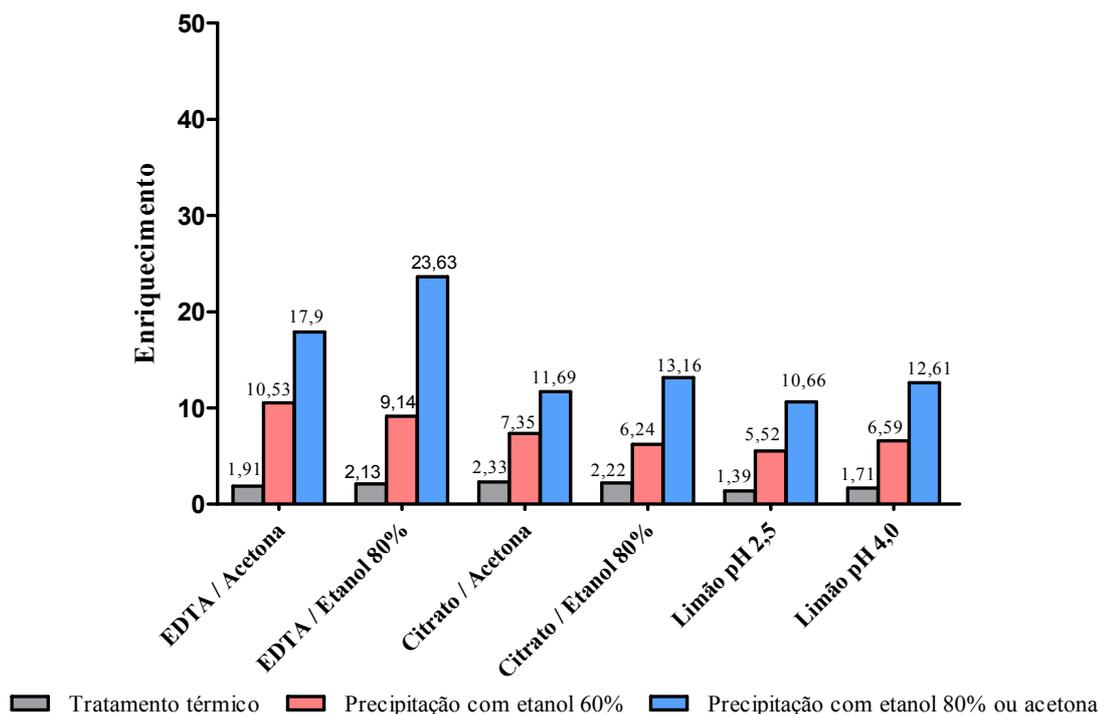


Figura 15: Gráfico do enriquecimento das preparações de BBI, considerando a inibição da hidrólise de γ -BTPNA pela quimotripsina. EDTA/Acetona: extratos tratados termicamente na presença de EDTA e precipitados com etanol 60% e acetona; EDTA/Etanol 80%: extratos tratados termicamente na presença de EDTA e precipitados com etanol 60% e 80%; Citrato/Acetona: extratos tratados termicamente na presença de citrato de sódio e precipitados com etanol 60% e acetona; Citrato/Etanol 80%: extratos tratados termicamente na presença de citrato de sódio e precipitados com etanol 60% e 80%; Limão pH 2,5: extratos obtidos com suco de limão pH 2,5; Limão pH 4,0: extratos obtidos com suco de limão pH 4,0. Os dados dessa tabela representam a média de dois ensaios independentes.

A análise da Figura 14 mostra que as precipitações com etanol 60%, comum em todas as preparações, proporcionaram redução em torno de 50% dos inibidores Bowman-Birk. Entretanto, modificações nas concentrações de etanol levaram a obtenção de amostras com menor grau de pureza (dados não mostrados).

Ao comparar as preparações obtidas pelos processos que utilizaram o EDTA como agente quelante, percebe-se que a amostra resultante da precipitação com etanol 80%, possui características que indicam aumento do grau de pureza, apesar de apresentar rendimento inferior àquela precipitada com acetona. Essas características podem ser observadas na Figura 15 e o perfil eletroforético está mostrado na Figura 12A. O benefício da utilização do etanol para a precipitação de proteínas não se limita à

obtenção de preparações mais puras, uma vez que o etanol não apresenta toxicidade em baixas concentrações, é facilmente adquirido e de menor custo que a acetona.

As análises de pureza e rendimento das amostras (Figuras 12, 13, 14 e 15) revelaram que a utilização de EDTA e precipitações com etanol foram mais eficientes para o enriquecimento do BBI nas preparações. O emprego dessa combinação resulta em uma preparação protéica com grau de pureza satisfatório e rendimento em torno de 29%. Por outro lado, o caráter inócuo do citrato, em concentrações compatíveis com aquelas encontradas em alimentos (Penniston *et al.*, 2008), torna a metodologia de obtenção do BBI com citrato e etanol bastante atraente. A utilização do suco de limão para a extração protéica, seria outra estratégia interessante, entretanto, observa-se que a mesma apresenta uma redução de aproximadamente 32% do rendimento, quando comparada com os processos que utilizaram citrato e etanol.

Tendo em vista as vantagens e desvantagens dos métodos de obtenção do BBI, propostos nesse trabalho, consideramos que as preparações obtidas com a utilização de citrato e etanol seriam as mais adequadas para o emprego em estudos envolvendo humanos. Outros experimentos que permitiram avaliar a pureza dessa preparação foram a identificação do BBI por Western blot e o perfil de eluição deste inibidor em cromatografia de fase reversa, descritos a seguir.

4.2.6. Identificação do BBI por Western blot

Considerando que as opções para a aquisição de anticorpos anti-BBI são escassas e de alto custo, camundongos Swiss foram imunizados com uma preparação de BBI de *Macrotyloma axillare* (BBIM) com o intuito de obter anti-soros específicos para BBI. O BBIM utilizado na imunização dos camundongos apresentou elevado grau de pureza, Figura 16.

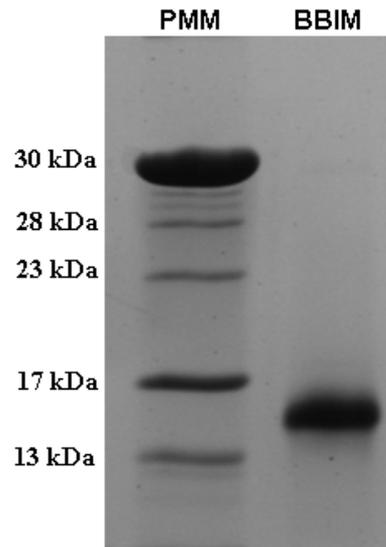


Figura 16: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) do BBIM. PMM: Padrão de massa molecular (ConA); BBIM: BBI de *Macrotyloma axillare*.

Até o momento duas isoformas de BBIM, conhecidas como DE-3 e DE-4, foram descritas na literatura (Joubert *et al.*, 1979). O alinhamento das seqüências primárias de BBIM (DE-3 e DE-4) e BBI de soja *Glycine max* (BBIS) mostrou 65,8% de identidade e a conservação dos 14 resíduos de cisteína; os quais contribuem para a alta homologia estrutural compartilhada por estes inibidores (Figura 17). Desta forma, previa-se uma reatividade cruzada quando o anti-soro obtido com o BBIM fosse utilizado para o reconhecimento de BBIS.



Figura 17: Alinhamento das seqüências primárias dos BBIS e BBIM através do programa ClustalW. *posições homólogas; ponto e dois pontos: indicam as posições onde a substituição é conservativa; espaço: posições onde as substituições não são conservativas. Os aminoácidos assinalados com as cores amarela e cinza formam as cabeças de inibição anti-tripsina e anti-quimotripsina, respectivamente.

A figura 18 mostrou que o anti-soro obtido reconheceu tanto os BBIM quanto o BBIS, na faixa esperada de massa molecular para ambas as moléculas. A análise por Western blot mostrou que todas as preparações de BBIS, resultantes de precipitações com solventes orgânicos, apresentaram BBI. As proteínas de baixa massa molecular resultantes das precipitações com etanol e acetona (Figura 12) não foram reconhecidas pelo anticorpo e, portanto podem ser resultantes de co-precipitação com o BBI. Por outro lado, as duas bandas protéicas observadas nas preparações onde se empregou precipitação com etanol a 60 e 80% coincidiram com a reatividade observada na membrana e, provavelmente constituem os únicos componentes protéicos destas preparações.

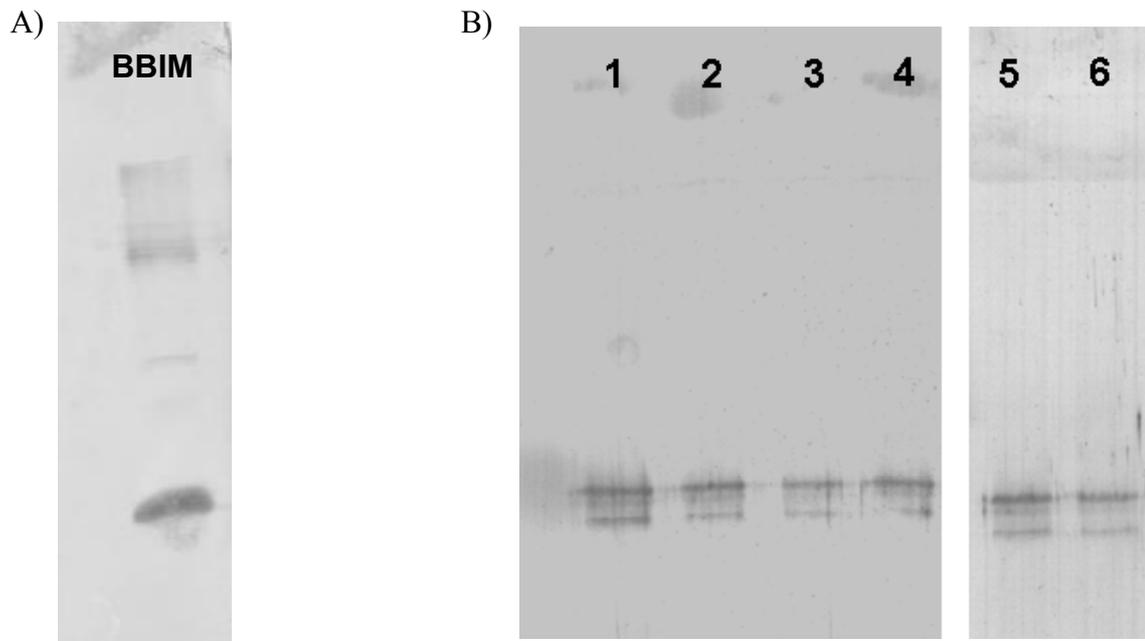


Figura 18: Western blot de BBIM e BBIS, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com BBIM. A) Western blot do BBIM purificado. B) Western blot de diferentes preparações de BBIS. Linha 1: Extrato protéico (pH 4,0) + EDTA precipitado com etanol 60% e acetona; Linha 2: Extrato protéico (pH 4,0) + EDTA precipitado com etanol 60% e 80%; Linha 3: Extrato protéico (pH 4,0) + citrato de sódio precipitado com etanol 60% e acetona; Linha 4: Extrato protéico (pH 4,0) + citrato de sódio precipitado com etanol 60% e 80%; Linha 5: Preparação obtida com limão em pH 2,5; Linha 6: Preparação obtida com limão em pH 4,0.

4.2.7. Análise da preparação de BBI através de cromatografia de fase reversa

As preparações de BBI obtidas com a utilização de citrato de sódio e etanol foram também submetidas à análise por cromatografia de fase reversa. Ao contrário do perfil eletroforético, a preparação apresentou vários componentes que puderam ser detectados a 280 nm, conforme cromatograma apresentado na Figura 19. A avaliação da atividade anti-tripsina das frações eluídas mostrou que os componentes compreendidos entre os tempos de retenção 9,5 e 10,5 min apresentaram atividade inibitória.

Com o intuito de eliminar possíveis contaminantes não protéicos, a amostra foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose. As frações resultantes da eluição com NaCl, que apresentaram atividade anti-tripsina, também foram analisadas por cromatografia de fase reversa (Figura 20). Esta etapa adicional de purificação removeu componentes que anteriormente apareciam entre os tempos de retenção, 0 e 7 minutos, entretanto, devido à semelhança dos perfis cromatográficos, esta etapa não foi considerada vantajosa para o processo de purificação.

As frações com atividade anti-tripsina, correspondentes ao tempo de retenção de 9,5 minutos, foram coletados e recromatografados em fase reversa para a obtenção de um isolado do componente ativo (Figura 21). Esse material foi analisado por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray* e apresentou massa molecular de 8527,681 Da, equivalente àquela descrita para o inibidor Bowman-Birk (Figura 22).

A obtenção de uma preparação de BBI purificado é relevante para o emprego em estudos experimentais que visam avaliar a atividade anti-carcinogênica específica desse inibidor. A presença de outros componentes constatada nos concentrados de BBI, utilizados nos estudos de atividade biológica, confunde as especulações relacionadas à elucidação do mecanismo de ação. Através da análise por eletroforese e cromatografia de fase reversa do BBIC obtido pelo método tradicional (Figura 23), observa-se a existência de várias substâncias contaminantes presentes nesse material, destacando-se a lunasina pela sua plausível atividade anti-tumoral (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2009).

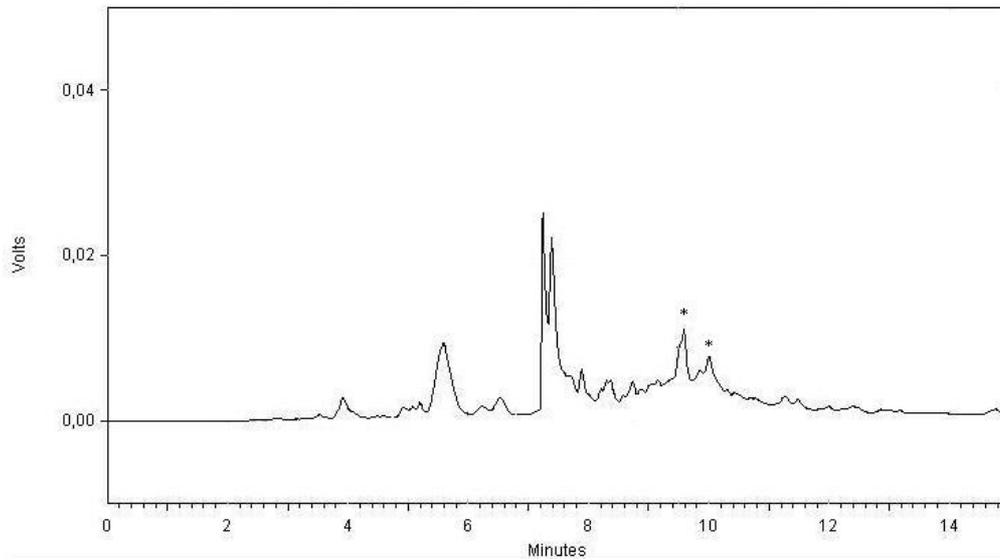


Figura 19: Análise cromatográfica em fase reversa do BBI obtido com citrato de sódio e etanol. Condições cromatográficas: Coluna 250 x 4,6 mm; FE: Varian OmniSpher C18, 5 μ L; FM: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,1%; Eluição por gradiente: 0 a 33% de B em 5 minutos, permanecendo constante até 15 minutos de eluição e chegando a 100% em 20 minutos; vazão: 1,0 mL min⁻¹ detecção: UV em 280 nm.

*Picos que apresentaram atividade anti-tripsina.

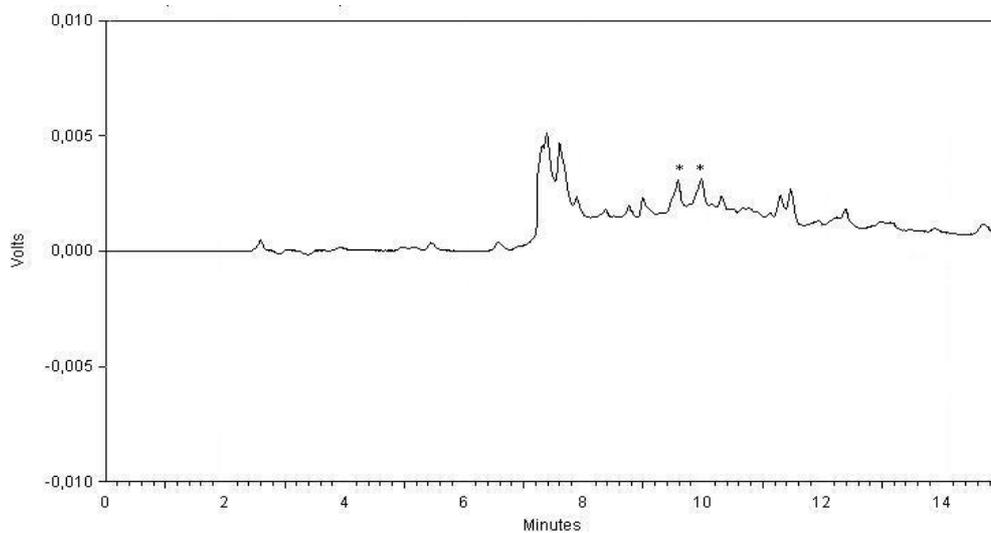


Figura 20: Análise cromatográfica em fase reversa da preparação de BBI submetida a cromatografia de troca iônica. Condições cromatográficas: Coluna 250 x 4,6 mm; FE: Varian OmniSpher C18, 5 μ L; FM: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,1%; Eluição por gradiente: 0 a 33% de B em 5 minutos, permanecendo constante até 15 minutos de eluição e chegando a 100% em 20 minutos; vazão: 1,0 mL min⁻¹ detecção: UV em 280 nm.

*Picos que apresentaram atividade anti-tripsina.

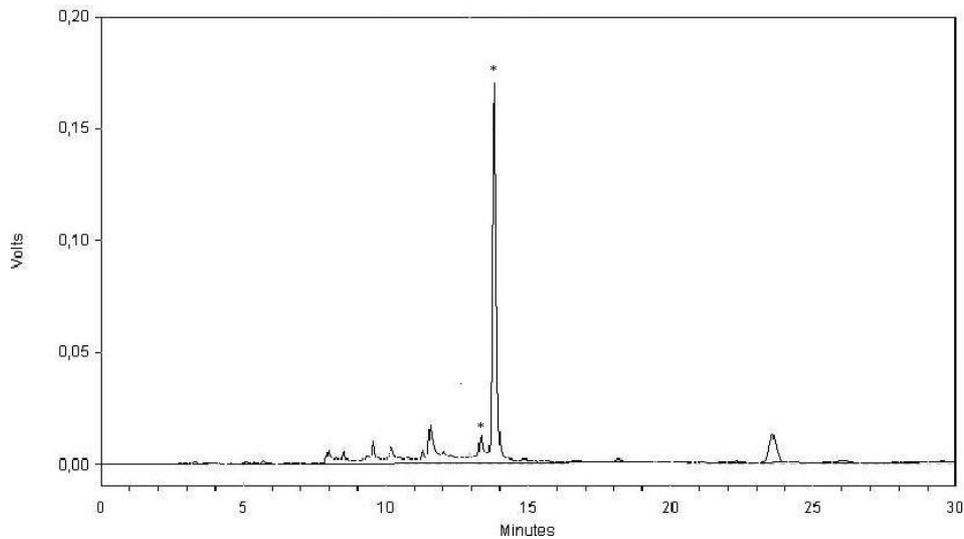


Figura 21: Análise cromatográfica em fase reversa da amostra referente ao pico com tempo de retenção 9,5 minutos. Condições cromatográficas: Coluna 250 x 4,6 mm; FE: Varian OmniSpher C18, 5 μ L; FM: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,1%; Eluição por gradiente: 0 a 15% de B em 5 minutos, permanecendo constante até 20 minutos de eluição, chega a 30% em 30 minutos e a 100 % em 35 minutos; vazão: 1,0 mL min⁻¹ detecção: UV em 280 nm.
*Picos que apresentaram atividade anti-tripsina.

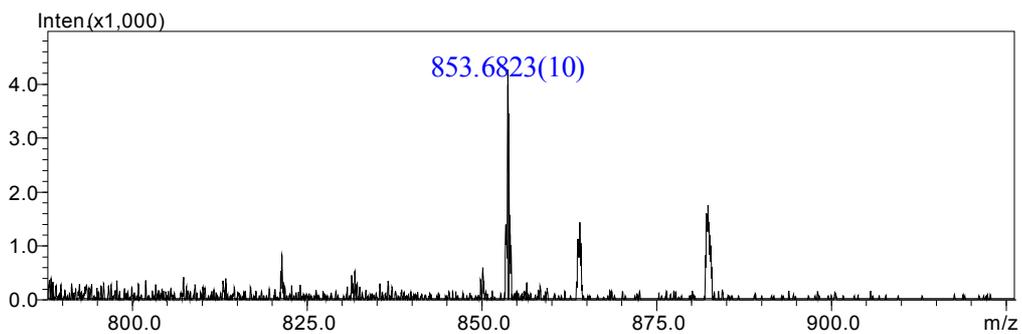


Figura 22: Identificação do isolado de BBI por espectrometria de massa em LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray*. O pico principal mostrado no espectro (853.6823) apresenta carga 10+, gerando massa molecular de 8527,681 Da

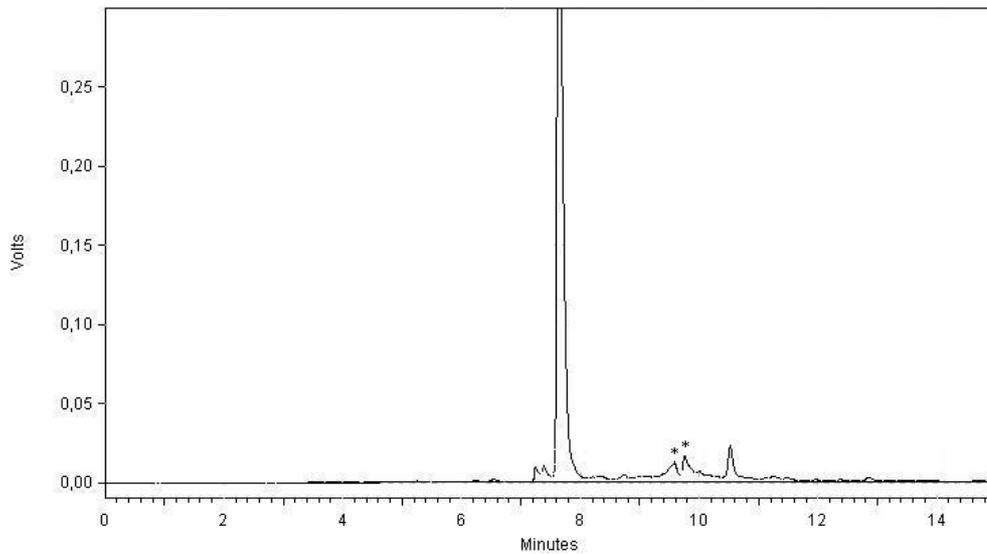


Figura 23: Análise cromatográfica em fase reversa do BBIC obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). Condições cromatográficas: Coluna 250 x 4,6 mm; FE: Varian OmniSpher C18, 5 μ L; FM: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,1%; Eluição por gradiente: 0 a 15% de B em 5 minutos, permanecendo constante até 20 minutos de eluição, chega a 30% em 30 minutos e a 100 % em 35 minutos; vazão: 1,0 mL min⁻¹ detecção: UV em 280 nm.

*Picos que apresentaram atividade anti-tripsina.

4.3. Quantificação do BBI em alimentos

Tendo em vista o efeito anti-carcinogênico do BBI, métodos que visam a quantificação desse inibidor, especialmente de sua forma ativa, são de grande importância para a avaliação das propriedades quimiopreventivas de alimentos. De acordo com Brandon e colaboradores (1991) e Losso (2008), a detecção do BBI através do emprego de técnicas imunoenzimáticas (ELISA e Western blot), mostrou-se eficiente considerando os parâmetros de sensibilidade e reprodutibilidade. Embora esses métodos pareçam ser adequados para a quantificação de BBI em alimentos, elas permitem que moléculas inativas desse inibidor sejam também detectadas. A inativação de moléculas de BBI por desnaturação pode ocorrer durante o processamento de alguns alimentos, sobretudo para aqueles obtidos a partir do emprego de altas temperaturas.

Conforme discutido anteriormente (item 4.2.2), o tratamento térmico a 85°C por 30 minutos dos extratos protéicos de soja reduziu a atividade inibitória referente ao

Kunitz enquanto a atividade do BBI foi mantida. Este método permitiu que os ensaios de atividade inibitória empregando tripsina e quimotripsina, após tratamento térmico em meio ácido, pudessem ser utilizados para a quantificação do BBI em alimentos. Essa técnica pode ser comparada aos ensaios imunoenzimáticos em termos de sensibilidade, uma vez que a constante de dissociação do BBI com as duas proteases é da ordem de 10^{-9} e que o limite de detecção do ensaio pode atingir concentrações mínimas de BBI (Gariani *et al.*, 1999). Para a obtenção de uma curva padrão, amostras de BBI purificado de soja, com concentrações protéicas previamente conhecidas, foram submetidas ao tratamento térmico a 85°C por 30 minutos em meio ácido. Após esse tratamento, observou-se que as concentrações de BBI e as atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina mantiveram uma correlação linear, sem perda de atividade (Figura 24). Essas curvas foram utilizadas como referência para a quantificação do BBI em alimentos.

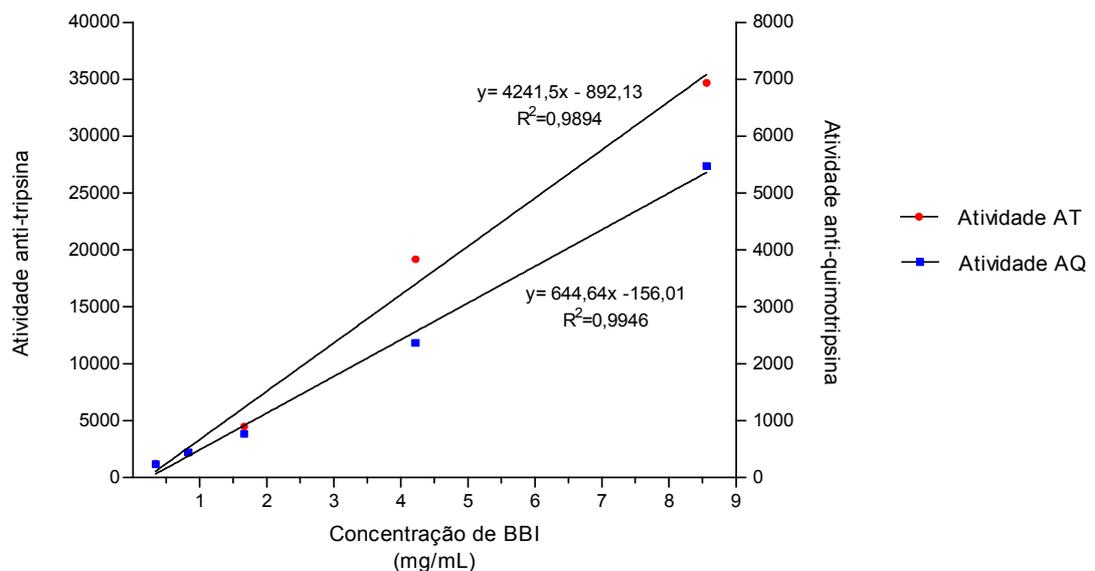


Figura 24: Gráfico das atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina de amostras contendo diferentes concentrações de BBI purificado. As atividades foram aferidas após tratamento térmico a 85°C.

Para validar o método de quantificação de BBI, quantidades conhecidas de BBI purificado foram adicionadas ao leite de soja como padrão interno e posteriormente submetidas ao tratamento térmico. A análise do gráfico que relaciona a concentração de BBI adicionado ao leite e as atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina após

aquecimento, mostra que as atividades inibitórias aumentaram de maneira linear com o aumento da concentração de BBI na amostra (Figura 25). A interseção da curva de calibração na ordenada refere-se à atividade inicial de BBI presente na amostra de leite de soja.

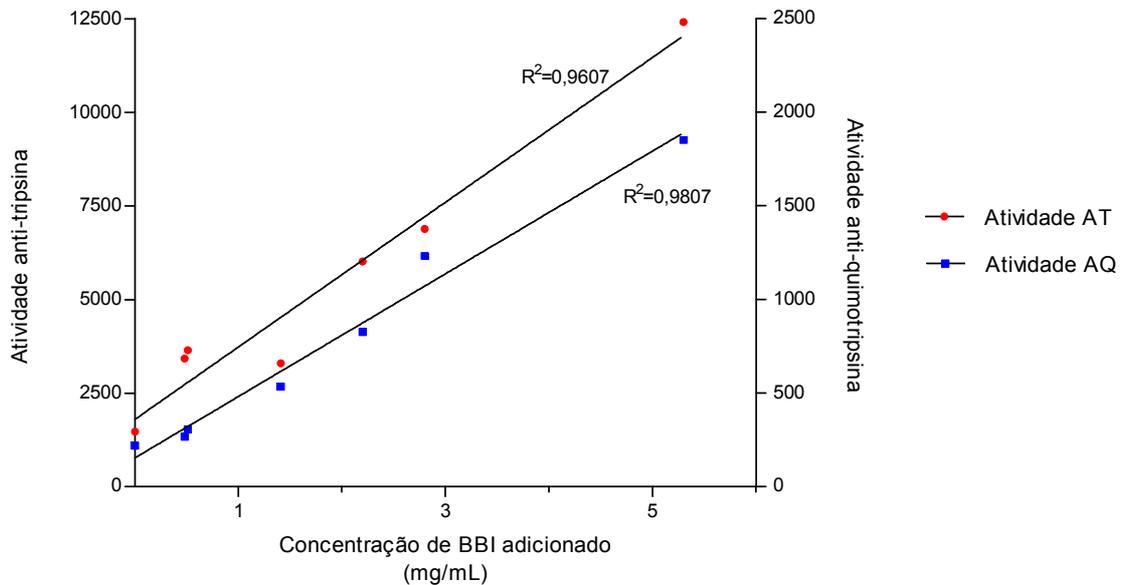


Figura 25: Gráfico das atividades anti-tripsina e anti-quimotripsina de amostras de leite de soja suplementados com diferentes concentrações de BBI purificado. As atividades foram aferidas após tratamento térmico a 85°C.

A partir da padronização da técnica, o BBI foi quantificado em alimentos derivados de soja a partir de análise de atividade inibitória. As concentrações de BBI encontradas em algumas amostras de alimentos estão descritas na tabela 1. A análise dessa tabela mostra que o extrato de soja integral e o leite de soja são os alimentos que apresentaram maiores concentrações de BBI. A quantidade desse inibidor encontrada no leite de soja foi comparável àquela determinada por Hernández-Ledesma e colaboradores (2009), empregando-se a técnica de Western blot. As diferenças de concentrações de BBI presentes nas amostras analisadas podem ser decorrentes do processo de fabricação ou do teor de soja utilizado nas preparações dos alimentos.

Tabela 1: Quantificação do BBI em alimentos derivados de soja baseada em ensaios de atividade anti-quimotripsina

Amostra	Ingredientes da composição	Concentração de proteínas	Atividade anti-quimotripsina	Concentração de BBI
A-1) Achocolatado	Extrato de soja	28,00 ^b	43,49	0,31 ^b
A-2) Cookies	Proteínas de soja	76,00 ^a	0	0
A-3) Extrato de soja	Extrato de soja	405,00 ^a	118,32	0,43 ^a
A-4) Leite de soja	Extrato de soja	25,00 ^b	104,77	0,40 ^b
A-5) Sopa contendo soja	Proteína texturizada de soja	191,11 ^a	0	0
A-6) Suco de abacaxi	Extrato de soja	6,00 ^b	29,15	0,29 ^b
A-7) Suco de abacaxi	Proteína isolada de soja	10,50 ^b	20,22	0,27 ^b
A-8) Suco de maçã	Extrato de soja	6,00 ^b	24,68	0,28 ^b
A-9) Suco de maçã	Proteína isolada de soja	10,50 ^b	22,93	0,28 ^b

^a Expressa como mg/g da amostra^b Expressa como mg/mL da amostra

Armstrong e colaboradores (2000) demonstraram que doses diárias de BBIC de até 1066 unidades inibitórias de quimotripsina, administradas em pacientes portadores de leucoplasia oral durante 1 mês, não desencadearam nenhum efeito tóxico e reduziram o tamanho das lesões provocadas pela doença. Esses dados reforçam a idéia de que esses inibidores são inócuos e podem ser consumidos pelo ser humano para a prevenção do câncer. Embora os alimentos derivados de soja sejam uma alternativa de baixo custo para o consumo humano, eles são ainda pouco consumidos pela população ocidental. Dessa maneira, testes de aceitação de alimentos suplementados com compostos bioativos como o BBI são importantes para promover o aumento do consumo dos mesmos. A proposta de análise sensorial de alimentos suplementados com a preparação de BBIS, obtida com limão e etanol, ainda permanece sob avaliação do Comitê de Ética de Pesquisas em Humanos da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.4. Consumo da ração suplementada com BBI e monitoramento do peso de camundongos tratados

Diante da impossibilidade de execução imediata da análise sensorial de alimentos suplementados com BBI, foi realizada uma avaliação do consumo de rações preparadas com adição deste inibidor, empregando-se camundongos. As preparações de

BBI, utilizadas para suplementação das rações, foram obtidas a partir de sementes de soja *Glycine max* e de *Macrotyloma axillare*. O interesse pela avaliação do consumo das rações enriquecidas com BBI de *Macrotyloma axillare* (BBIM) deve-se aos resultados obtidos em nosso laboratório, que demonstraram que esse inibidor possui atividade quimiopreventiva superior ao BBI de soja (trabalho em fase de conclusão). A *Macrotyloma axillare* é uma leguminosa rasteira, originária da África, utilizada na alimentação do gado (United States Department of Agriculture - Plants Database, 2003; Better Pastures for the Tropics and Subtropics, 2003).

Fêmeas de camundongos *Swiss*, divididos em 3 grupos, receberam durante 4 semanas rações *in natura* suplementadas ou não com 0,1% p/p de BBIS ou BBIM. Durante esse período, avaliou-se o consumo de ração por grupo de animal e o peso dos animais foi monitorado semanalmente. As figuras 26 e 27 mostram que não houve diferença significativa no consumo de ração e no ganho de peso dos animais que receberam ração suplementada com BBI, em relação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que a suplementação de alimentos com BBI não altera a aceitação dos mesmos, pelos camundongos.

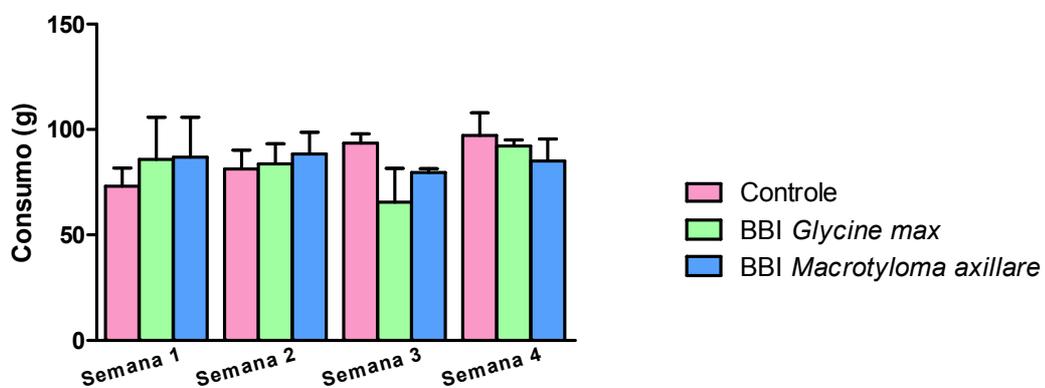


Figura 26: Consumo de rações por grupo de camundongos. Controle: grupo de camundongos que receberam rações sem adição de BBI; BBI *Glycine max*: grupo de camundongos que receberam rações suplementadas com BBIS; BBI *Macrotyloma axillare*: grupo de camundongos que receberam rações suplementadas com BBIM. Os dados expressos referem-se à média do consumo de 2 dias por semana.

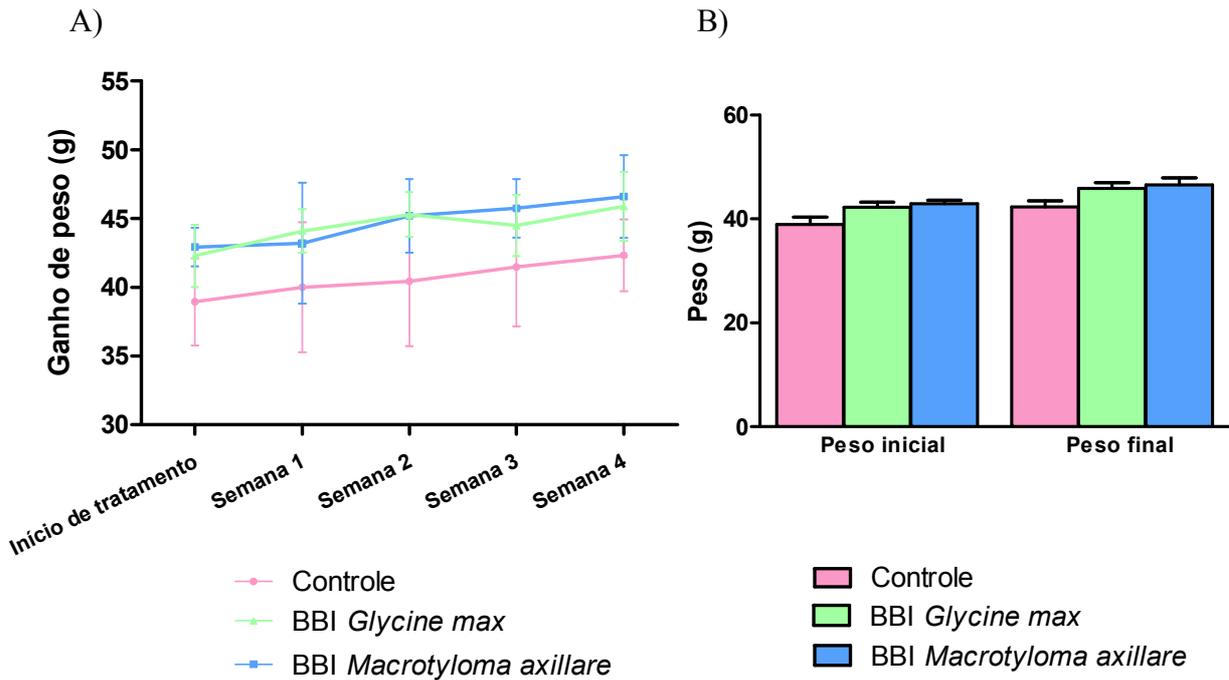


Figura 27: Monitoramento do peso de camundongos alimentados com rações suplementadas ou não com BBI. A) Ganho de peso médio de camundongos alimentados com rações suplementadas ou não com BBI. B) Peso médio dos camundongos no início e término do tratamento. Controle: grupo de camundongos que receberam rações sem adição de BBI; BBI *Glycine max*: grupo de camundongos que receberam rações suplementadas com BBIS; BBI *Macrotyloma axillare*: grupo de camundongos que receberam rações suplementadas com BBIM.

4.5. Obtenção de anti-soros específicos para BBI

Com o objetivo de obter outros anti-soros específicos para a detecção de BBI, camundongos Swiss foram imunizados com preparações isoladas de BBI de *Glycine max*, e peptídeo sintético, SCTFSLPPQCYGGGGG, correspondente à cabeça de inibição da quimotripsina (PAQ-1). Conforme mostrado anteriormente na Figura 18, o Western blot de BBIS e BBIM tratados com anti-soro de animais imunizados com BBI de *Macrotyloma axillare* (AS-BBIM) apresentou maior reatividade para as bandas na região de 13 kDa (título 1:500). Esse anti-soro mostrou-se específico para a detecção de BBI de soja. O anti-soro obtido com BBI de soja (AS-BBIS) não reconheceu os inibidores (BBIS, BBIM), mesmo em títulos menores (1:100) através da técnica de Western blot (Figura 28). O anti-soro obtido pela imunização de camundongos com o peptídeo sintético (PAQ-1) reconheceu o BBIM e BBIS, além da sua própria estrutura

(Figuras 29 e 30); demonstrando que a cabeça de inibição anti-quimotripsina é imunogênica. Considerando que a resposta imune não tenha sido influenciada pelo adjuvante utilizado (hidróxido de alumínio), esses resultados sugerem uma baixa imunogenicidade do BBIS em relação ao BBIM e ao PAQ-1. Esta hipótese é reforçada pela existência de diferenças estruturais decorrentes de pequenas variações de seqüências primárias, as quais podem constituir epitopos imunogênicos dos BBI.

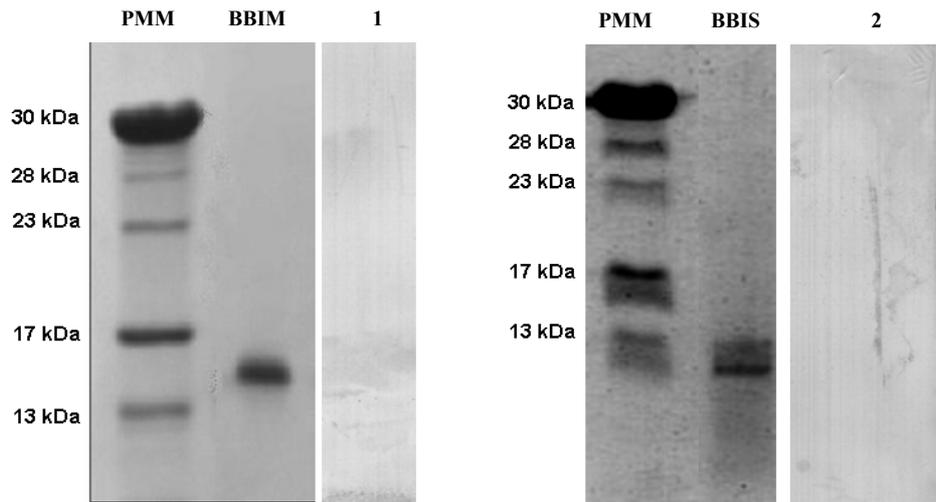


Figura 28: Western blot de BBIM e BBIS, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com BBIS. PPM: Padrão de massa molecular (ConA) em SDS-PAGE; BBIM: BBI de *Macrotyloma axillare* em SDS-PAGE; BBIS: BBI de *Glycine max* em SDS-PAGE; 1: western blot de BBIM; 2: Western blot de BBIS

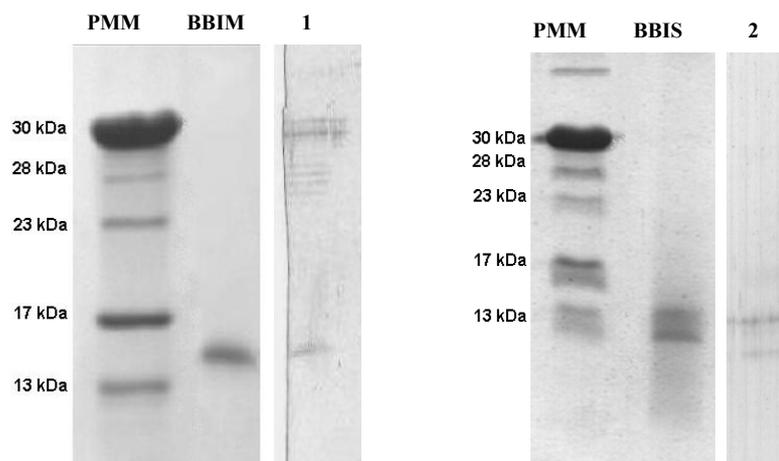


Figura 29: Western blot de BBIM e BBIS, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com peptídeo sintético SCTFSLPPQCYGGGGG. PPM: Padrão de massa molecular (ConA) em SDS-PAGE; BBIM: BBI de *Macrotyloma axillare* em SDS-PAGE; BBIS: BBI de *Glycine max* em SDS-PAGE; 1: Western blot de BBIM; 2: Western blot de BBIS.

Diante da possibilidade de detecção dos inibidores citados acima em condições de maior sensibilidade, amostras de inibidores, nativos e reduzidos/alquilados, foram retidas em membranas PVDF através de Dot blot e expostas aos anti-soros. Os resultados mostraram claramente que o anti-soro AS-BBIM foi mais reativo que o AS-BBIS, uma vez que esse último apresentou reatividade extremamente baixa (Figura 30). Todos os anti-soros se mostraram mais reativos aos inibidores em sua forma nativa (utilizados para imunização) em comparação com a reatividade observada para as formas reduzidas e alquiladas.

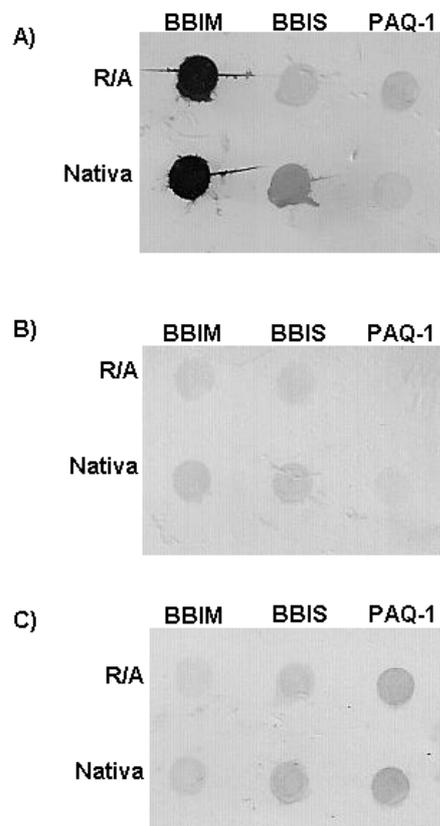


Figura 30: Dot blot de inibidores de proteases em suas formas nativas e reduzidas/alquiladas. A) Dot blot de BBIM, BBIS e PAQ-1, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com BBIM. B) Dot blot de BBIM, BBIS e PAQ-1, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com BBIS. C) Dot blot de BBIM, BBIS e PAQ-1, utilizando o anti-soro de camundongos imunizados com PAQ-1. R/A: moléculas reduzidas e alquiladas; Nativa: moléculas nativas.

Os resultados apresentados pelas Figuras 18 e 30 demonstraram que o AS-BBIM possui elevada reatividade para os inibidores. Desta forma, este anti-soro poderia ser empregado para a identificação dos inibidores em amostras biológicas complexas.

Entretanto, ao utilizá-lo como ferramenta de quantificação em amostras de leite de soja acidificadas a pH 4,0 e tratadas à 85°C por 30 minutos, não foi possível obter correlação entre as quantidades de BBI adicionadas à membrana e a intensidade da revelação (Figura 31). É provável que essas amostras devam ser tratadas previamente por outros procedimentos, com o objetivo de reduzir a concentração de proteínas interferentes para se obter sucesso nessa técnica.

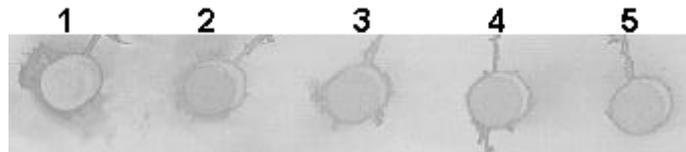


Figura 31: Dot blot de amostras de leite de soja enriquecidas com diferentes concentrações de BBI, utilizando anti-soro de camundongos imunizados com BBIM. 1: leite + 5,3 mg de BBI; 2: leite + 2,2 mg de BBI; 3: leite + 1,4 mg de BBI; 4: leite + 0,5 mg de BBI; 5: leite + 0,3 mg de BBI.

4.6. Análise comparativa da imunogenicidade dos Inibidores Bowman-Birk de *Glycine max* e *Macrotyloma axillare*

Para análise do potencial imunogênico dos BBI, camundongos foram alimentados durante 30 dias com rações suplementadas com 0,1% p/p de BBIM e BBIS. Os soros obtidos reconheceram as três formas de inibidores, entretanto, todos apresentaram maior reatividade para o BBIS (Figura 32). Os soros de animais alimentados com BBIM, assim como aqueles imunizados com essa proteína, apresentaram-se mais reativos para as formas de inibidores, que os demais soros.

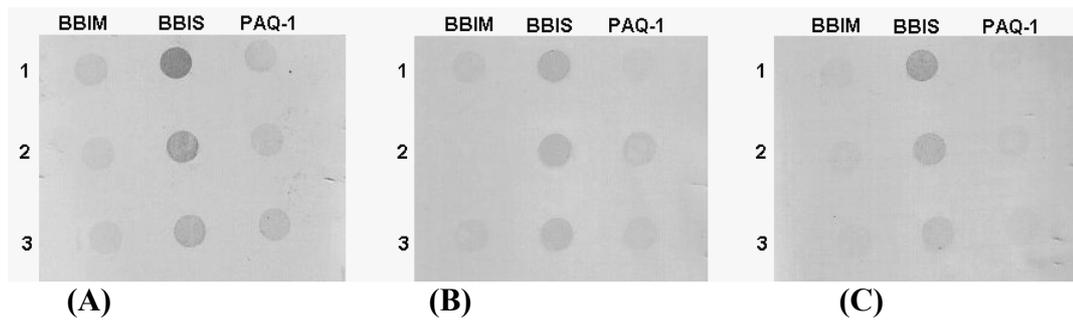


Figura 32: Dot blot de inibidores de proteases, utilizando soro de camundongos alimentados com rações suplementadas ou não suplementadas com BBI. A) Dot blot de BBIM, BBIS e PAQ-1, utilizando o soro de camundongos alimentados com ração suplementada com BBIM. B) Dot blot de BBIM, BBIS e PAQ-1, utilizando o soro de camundongos alimentados com ração suplementada com BBIS. C) Dot blot de BBIM, BBIS e PAQ-1, utilizando o soro de camundongos alimentados com ração sem suplementação. 1, 2 e 3: indicam a quantidade de inibidor, 10, 5 e 2,5 µg de inibidor, respectivamente.

Esses resultados demonstraram que camundongos alimentados com ração contendo ingredientes à base de leguminosas, apresentaram anticorpos naturais contra o BBI os quais poderiam se ligar ao BBI presente na circulação sanguínea, reduzindo a atividade biológica desse inibidor como preventivo do câncer. A análise da cristalografia de raio-X (Song *et al.*, 1999), proposta para o BBI, evidenciou a disponibilidade das cabeças de inibição de tripsina e quimotripsina com orientação para o meio aquoso. Sugere-se, portanto, que as regiões inibitórias estão acessíveis para a interação com enzimas proteolíticas e anticorpos. Considerando a capacidade imunogênica da cabeça de inibição PAQ-1 e a acessibilidade dessa região molecular, é provável que anticorpos naturais sejam dirigidos aos sítios de inibição, portanto, parte dos inibidores absorvidos e presentes na circulação sanguínea estariam bloqueados. A quantificação desses inibidores por métodos imunoenzimáticos empregando anticorpos dirigidos às cabeças de inibição, forneceria informações úteis para a determinação da concentração efetiva de inibidor ativo no plasma.

5. Conclusões

5. Conclusões

- Todos os processos testados resultaram em uma preparação de BBI de melhor qualidade quando comparadas às metodologias descritas na literatura. As análises por SDS-PAGE e Western blot demonstraram que todas as preparações obtidas com os métodos propostos apresentaram elevada homogeneidade. A inclusão de quelantes de íons divalentes no método de preparação de BBI possibilitou melhores resultados na purificação desse inibidor;
- O método desenvolvido para a quantificação de BBI ativo em alimentos foi de fácil execução e apresentou sensibilidade comparável às técnicas de ELISA e Western blot, tipicamente utilizadas.
- Não foram observadas diferenças estatísticas no ganho de peso e consumo de ração entre o grupo de camundongos tratados com BBIS e BBIM e o grupo controle. Esses resultados demonstraram que a suplementação da dieta com BBI não alterou a aceitação dos alimentos oferecidos;
- O BBIM mostrou-se mais imunogênico que o BBIS, além de gerar anti-soros mais específicos para a detecção desses inibidores;
- Verificou-se a presença de anticorpos naturais anti-BBI em soros de camundongos não tratados com BBI e aumento do título em animais que receberam ração suplementada com BBIM. Esses dados demonstram que o BBI é imunogênico pela via oral e que esses inibidores podem ter sua atividade bloqueada por anticorpos circulantes.
- Constatou-se que a presença de anticorpos anti-BBI no soro de camundongos pode limitar a atividade inibitória do BBI absorvido.

6. Perspectivas

6. Perspectivas

- A metodologia de preparação do BBI poderá ser adaptada para escala industrial, com o objetivo de produzir quantidades suficientes dessa substância para suplementar alimentos, com mínimas alterações de suas propriedades sensoriais;
- Realizar testes de análise sensorial para avaliação da aceitação de alimentos suplementados com BBI pelos humanos;
- Estudar a interação anticorpos-BBI e determinar a concentração de BBI ativo em amostras de soro de camundongos imunizados com BBI pela via oral.

7. Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Andrade, M. H., Silva, E., and Mares-Guia, M. (1990). A plausible identification of the secondary binding site in trypsin and trypsinogen. *Braz J Med Biol Res* 23, 1223-1231.
- Antao, C. M., and Malcata, F. X. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol Biochem* 43, 637-650.
- Armstrong, W. B., Kennedy, A. R., Wan, X. S., Atiba, J., McLaren, C. E., and Meyskens, F. L., Jr. (2000a). Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 43-47.
- Armstrong, W. B., Kennedy, A. R., Wan, X. S., Taylor, T. H., Nguyen, Q. A., Jensen, J., Thompson, W., Lagerberg, W., and Meyskens, F. L., Jr. (2000b). Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. *Clin Cancer Res* 6, 4684-4691.
- Baek, J. M., Song, J. C., Choi, Y. D., and Kim, S. I. (1994). Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoinhibitors. *Biosci Biotechnol Biochem* 58, 843-846.
- Better Pastures for the Tropics and Subtropics. *Macrotyloma axillare* – <http://tropicalgrasslands.asn.au/pastures/axillr.htm>. 2003. (Sítio da Internet).
- Billings, P. C., Brandon, D. L., and Habres, J. M. (1991). Internalisation of the Bowman-Birk protease inhibitor by intestinal epithelial cells. *Eur J Cancer* 27, 903-908.
- Billings, P. C., St Clair, W. H., Maki, P. A., and Kennedy, A. R. (1992). Distribution of the Bowman Birk protease inhibitor in mice following oral administration. *Cancer Lett* 62, 191-197.
- Bode, W., and Huber, R. (1991). Proteinase-protein inhibitor interaction. *Biomed Biochim Acta* 50, 437-446.
- Bode, W., and Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta* 1477, 241-252.
- Borgono, C. A., and Diamandis, E. P. (2004). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 876-890.
- Borrello, M. G., Degl'Innocenti, D., and Pierotti, M. A. (2008). Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. *Cancer Lett* 267, 262-270.

- Brenna, S. M., and Syrjanen, K. J. (2003). Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Sao Paulo Med J* 121, 128-132.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3, e85.
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Iorio, M. V., Visone, R., Sever, N. I., Fabbri, M., *et al.* (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353, 1793-1801.
- Chen, P., Rose, J., Love, R., Wei, C. H., and Wang, B. C. (1992). Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. *J Biol Chem* 267, 1990-1994.
- Clemente, A., and Domoney, C. (2006). Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Curr Protein Pept Sci* 7, 201-216.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358, 502-511.
- Daugherty, A. L., and Mrsny, R. J. (1999). Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *Pharm Sci Technol Today* 2, 281-287.
- DeClerck, Y. A., and Imren, S. (1994). Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur J Cancer* 30A, 2170-2180.
- Deshimaru, M., Yoshimi, S., Shioi, S., and Terada, S. (2004). Multigene family for Bowman-Birk type proteinase inhibitors of wild soja and soybean: the presence of two BBI-A genes and pseudogenes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1279-1286.
- DiPietro, C. M., and Liener, I. E. (1980) Heat Inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk Soybean Protease Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 37, 39-44.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.
- Franco, O. L., Grossi de Sa, M. F., Sales, M. P., Mello, L. V., Oliveira, A. S., and Rigden, D. J. (2002). Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. *Proteins* 49, 335-341.
- Frenkel, K., Chrzan, K., Ryan, C. A., Wiesner, R., and Troll, W. (1987). Chymotrypsin-specific protease inhibitors decrease H₂O₂ formation by activated human polymorphonuclear leukocytes. *Carcinogenesis* 8, 1207-1212.
- Gariani, T., and Leatherbarrow, R. J. (1997). Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. *J Pept Res* 49, 467-475.

- Gariani, T., McBride, J. D., and Leatherbarrow, R. J. (1999). The role of the P2' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin. *Studies on P2' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. Biochim Biophys Acta 1431*, 232-237.
- Gettins, P. G. (2002). Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev 102*, 4751-4804.
- 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., *et al.* (2005). Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). *Plant Physiol Biochem 43*, 1095-1102.
- Hammond, R. W., Foard, D. E., and Larkins, B. A. (1984). Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. *J Biol Chem 259*, 9883-9890.
- Haq, S. K., Atif, S. M., and Khan, R. H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch Biochem Biophys 431*, 145-159.
- Hasina, R., and Lingen, M. W. (2001). Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ 65*, 1282-1290.
- Heibges, A., Salamini, F., and Gebhardt, C. (2003). Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol Genet Genomics 269*, 535-541.
- Hernandez-Ledesma, B., Hsieh, C. C., and de Lumen, B. O. (2009). Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides 30*, 426-430.
- Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.C., and Lumen, B.O. (2009). Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US commercial soy foods. *Food Chemistry 115*, 574–580
- Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. (2003). Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional. Rio de Janeiro.
- Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. (2006). A situação do câncer no Brasil. Rio de Janeiro.
- Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. (2009) Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro.
- Ishida, T. (2006). Low-barrier hydrogen bond hypothesis in the catalytic triad residue of serine proteases: correlation between structural rearrangement and chemical shifts in the acylation process. *Biochemistry 45*, 5413-5420.

- Jonas, W. B. (1995). Effectiveness of EDTA chelation therapy. *Circulation* 92, 1352.
- Joubert, F. J., Kruger, H., Townshend, G. S., and Botes, D. P. (1979). Purification, some properties and the complete primary structures of two protease inhibitors (DE-3 and DE-4) from *Macrotyloma axillare* seed. *Eur J Biochem* 97, 85-91.
- Jorde L.B., Carey JC, Bamshad MJ, White RL. (2000) *Genética Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kato, Y., Nagashima, Y., Koshikawa, N., Miyagi, Y., Yasumitsu, H., and Miyazaki, K. (1998). Production of trypsins by human gastric cancer cells correlates with their malignant phenotype. *Eur J Cancer* 34, 1117-1123.
- 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., *et al.* (2000). Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr* 130, 467S-471S.
- Kennedy, A. R. (1998a). The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr* 68, 1406S-1412S.
- Kennedy, A. R. (1998b). Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther* 78, 167-209.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 376-385.
- Kisselev, A. F., Callard, A., and Goldberg, A. L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 281, 8582-8590.
- Koblinski, J. E., Ahram, M., and Sloane, B. F. (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 291, 113-135.
- Koshikawa, N., Hasegawa, S., Nagashima, Y., Mitsuhashi, K., Tsubota, Y., Miyata, S., Miyagi, Y., Yasumitsu, H., and Miyazaki, K. (1998). Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am J Pathol* 153, 937-944.
- Kowalski, D., and Laskowski, M., Jr. (1976). Chemical-enzymatic insertion of an amino acid residue in the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry* 15, 1309-1315.
- Kumar, P., Sreerama, Y. N., and Gowda, L. R. (2002). Formation of Bowman-Birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichos biflorus*). *Phytochemistry* 60, 581-588.
- Laufs, S., Schumacher, J., and Allgayer, H. (2006). Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor

- progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* 5, 1760-1771.
- Liu, B., Schofield, C. J., and Wilmouth, R. C. (2006). Structural analyses on intermediates in serine protease catalysis. *J Biol Chem* 281, 24024-24035.
- Losso, J. N. (2008). The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48, 94-118.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Macleod, K. (2000). Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 10, 81-93.
- Maeda, K., Chung, Y. S., Takatsuka, S., Ogawa, Y., Sawada, T., Yamashita, Y., Onoda, N., Kato, Y., Nitta, A., Arimoto, Y., and *et al.* (1995). Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 13, 477-481.
- Malkowicz, S. B., McKenna, W. G., Vaughn, D. J., Wan, X. S., Propert, K. J., Rockwell, K., Marks, S. H., Wein, A. J., and Kennedy, A. R. (2001). Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 48, 16-28.
- McBride, J. D., Brauer, A. B., Nievo, M., and Leatherbarrow, R. J. (1998). The role of threonine in the P2 position of Bowman-Birk proteinase inhibitors: studies on P2 variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. *J Mol Biol* 282, 447-458.
- McGurl, B., Mukherjee, S., Kahn, M., and Ryan, C. A. (1995). Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) cDNAs from alfalfa leaves (*Medicago sativa* var. Vernema): the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. *Plant Mol Biol* 27, 995-1001.
- Merrifield R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J.Am.Chem.Soc.* 85, 2149-2154.
- Messina, M., and Redmond, G. (2006). Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature. *Thyroid* 16, 249-258.
- Norioka, S., and Ikenaka, T. (1983). Amino acid sequences of trypsin-chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I, and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. *J Biochem* 94, 589-599.
- Norioka, S., Omichi, K., and Ikenaka, T. (1982). Purification and characterization of protease inhibitors from peanuts (*Arachis hypogaea*). *J Biochem* 91, 1427-1434.

- Nyberg, P., Ylipalosaari, M., Sorsa, T., and Salo, T. (2006). Trypsins and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res* 312, 1219-1228.
- Odani, S., and Ikenaka, T. (1973). Scission of soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor into two small fragments having either trypsin or chymotrypsin inhibitory activity. *J Biochem* 74, 857-860.
- Odani, S., Koide, T., and Ono, T. (1986). Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. *J Biochem* 100, 975-983.
- Oh, Y. J., and Sung, M. K. (2001). Soybean saponins inhibit cell proliferation by suppressing PKC activation and induce differentiation of HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer* 39, 132-138.
- 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., and Sampaio, C. A. (2000). Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim Biophys Acta* 1477, 64-74.
- Osborne, C., Wilson, P., and Tripathy, D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9, 361-377.
- Osman, M.A., Reid, P.M. & Weber, C.W. (2002) Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. *Food Chemistry* 78, 419-423.
- Penniston, K. L., Nakada, S. Y., Holmes, R. P., and Assimos, D. G. (2008). Quantitative assessment of citric acid in lemon juice, lime juice, and commercially-available fruit juice products. *J Endourol* 22, 567-570.
- Perona, J. J., Hedstrom, L., Rutter, W. J., and Fletterick, R. J. (1995). Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry* 34, 1489-1499.
- Poon, R. T., Fan, S. T., and Wong, J. (2003). Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches. *Ann Surg* 238, 9-28.
- Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D., and James, K. E. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* 102, 4639-4750.
- Prakash B., Murthy M.R.N., Sreerama Y.N., Rao D.R. & Gowda L.R. (1997) Studies on simultaneous inhibition of trypsin and chymotrypsin by horsegram Bowman-Birk inhibitor. *J.Biosci.* 22, 545-554.

- Puente, X. S., Sanchez, L. M., Overall, C. M., and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 4, 544-558.
- Rakwal, R., Kumar Agrawal, G., and Jwa, N. S. (2001). Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene* 263, 189-198.
- Read M.N.G.R. (1986) *Proteinase Inhibitors*. Elsevier Science 301-335.
- Richardson M. (1997) The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. *Phytochemistry* 3,159-169.
- Richardson M. (1991) Seed Storage Proteins: The enzyme Inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry* 5, 259-305.
- Rittenhouse, H. G., Finlay, J. A., Mikolajczyk, S. D., and Partin, A. W. (1998). Human Kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Crit Rev Clin Lab Sci* 35, 275-368.
- Rohrmeier, T., and Lehle, L. (1993). WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors. *Plant Mol Biol* 22, 783-792.
- Rossmann, T. G., and Troll, W. (1980). Protease inhibitors in carcinogenesis: possible sites of action. *Carcinog Compr Surv* 5, 127-143.
- Ryan, C.A. (1981) Proteinase inhibitors. In A. Marcus, ed, *Biochemistry of Plants*, Vol6. Academic Press, New York, 351-370.
- Ryan C.A. (1990) Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann Rev Phytopathol.* 28, 425-449.
- Santana, Marcos Aurélio. Isolamento, Propriedades Bioquímicas e Estudos Biológicos da Lectina de Semente da *Macrotyloma axillare*. Ouro Preto: UFOP, 2004. 36p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.
- Santos, Alexandre Gonçalves. Estudos farmacocinéticos de Inibidores Bowman-Birk da semente de *Macrotyloma axillare* em camundongos Swiss. Ouro Preto: UFOP, 2006. 85 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.
- Sergei, D.V.; Gariev, I.A.; Uporov I.V. (2005) Catalytic sites of hydrolases: structures and catalytic cycles. *Russ Chem.* 74, 61-76.
- Sgarbieri, V. C., and Whitaker, J. R. (1982). Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Adv Food Res* 28, 93-166.

- Song, H. K., and Suh, S. W. (1998). Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J Mol Biol* 275, 347-363.
- St Clair, W. H., Billings, P. C., Carew, J. A., Keller-McGandy, C., Newberne, P., and Kennedy, A. R. (1990a). Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res* 50, 580-586.
- St Clair, W. H., Billings, P. C., and Kennedy, A. R. (1990b). The effects of the Bowman-Birk protease inhibitor on c-myc expression and cell proliferation in the unirradiated and irradiated mouse colon. *Cancer Lett* 52, 145-152.
- Stewart, B. W., and Coates, A. S. (2005). Cancer prevention: a global perspective. *J Clin Oncol* 23, 392-403.
- Tanaka, A. S., Sampaio, M. U., Mentele, R., Auerswald, E. A., and Sampaio, C. A. (1996). Sequence of a new Bowman-Birk inhibitor from *Torresea acreana* seeds and comparison with *Torresea cearensis* trypsin inhibitor (TcTI2). *J Protein Chem* 15, 553-560.
- Tanaka, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 12-36.
- Tsatsanis, C., and Spandidos, D. A. (2000). The role of oncogenic kinases in human cancer (Review). *Int J Mol Med* 5, 583-590.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5, 785-799.
- United States Department of Agriculture – Plants Database – *Macrotyloma axillare*. <http://plants.usda.gov/index.html> . 2003. (Sítio da *Internet*).
- Voet, D., Voet, J.G. & Pratt, C.W. (2000) Catálise enzimática. In *Fundamentos de Bioquímica*. Primeira edição Ed. Artes Médicas Sul. Porto Alegre, 281-316.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2257-2261.
- Voutsadakis, I. A. (2008). The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 1782, 800-808.
- Ware, J. H., Wan, X. S., and Kennedy, A. R. (1999). Bowman-Birk inhibitor suppresses production of superoxide anion radicals in differentiated HL-60 cells. *Nutr Cancer* 33, 174-177.

- Waters, W. F. (2001). Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. *J Community Health* 26, 79-92.
- Weder, J. K. (1986). Inhibition of human proteinases by grain legumes. *Adv Exp Med Biol* 199, 239-279.
- Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., and Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324, 1-8.
- Weinberg, R. A. (1983). Oncogenes and the molecular biology of cancer. *J Cell Biol* 97, 1661-1662.
- WHO- World Health Organization. www.euro.who.int/mediacentre/PR/2010. 2010 (*Sítio da internet*).
- World Health Organization (2002). Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica*.5,366-70.
- Zhang, L., Wan, X. S., Donahue, J. J., Ware, J. H., and Kennedy, A. R. (1999). 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* 33, 165-173.

8. Apêndice

8. Apêndice

Tabelas de purificação para obtenção de BBI:

Metodologia 1: BBI obtido através de tratamento térmico na presença de EDTA e precipitações com etanol e acetona.

Tabela 2: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina

Etapas de purificação	Volume (mL)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,85	22,02	18,71	1.593,28	1.354,28	72,38	100,00	0
Tratamento Térmico	0,78	10,19	7,94	1.413,12	1.102,23	138,71	81,38	1,91
Precipitação com Etanol 60%	1,20	0,60	0,72	457,50	549,00	762,50	40,53	10,53
Precipitação com Acetona	0,50	0,66	0,33	855,20	427,60	1.295,75	31,57	17,90

Tabela 3: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina

Etapas de purificação	Volume (mL)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,85	22,02	18,71	61.265,92	52.076,03	2.783,32	100,00	0
Tratamento Térmico	0,78	10,19	7,94	27.274,24	21.273,90	2.679,33	40,85	0,96
Precipitação com Etanol 60%	1,20	0,60	0,72	4.109,60	4.931,51	6.849,32	9,46	2,46
Precipitação com Acetona	0,50	0,66	0,33	6.602,40	3.301,20	10.003,63	6,33	3,59

Metodologia 2: BBI obtido através de tratamento térmico na presença de EDTA e precipitações com etanol 60 e 80%

Tabela 4: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina

Etapas de purificação	Volume (ml)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,90	21,88	19,69	1.576,24	1.418,98	72,06	100,00	0
Tratamento Térmico	0,81	9,89	8,01	1.519,36	1.230,68	153,64	86,73	2,13
Precipitação com Etanol 60%	1,32	0,60	0,72	359,12	474,04	658,38	33,40	9,14
Precipitação com Etanol 80%	0,50	0,48	0,24	817,60	408,80	1.703,33	28,81	23,63

Tabela 5: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina

Etapas de purificação	Volume (mL)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,90	21,88	19,69	61.255,68	55.130,11	2.799,90	100,00	0
Tratamento Térmico	0,81	9,89	8,01	26.910,72	21.797,68	2.721,30	39,53	0,97
Precipitação com Etanol 60%	1,32	0,60	0,72	5.031,68	6.641,81	9.224,74	12,04	3,29
Precipitação com Etanol 80%	0,50	0,48	0,24	7.520,00	3.760,00	15.666,66	6,82	5,59

Metodologia 3: BBI obtido através de tratamento térmico na presença de citrato e precipitações com etanol 60 e 80%

Tabela 6: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina

Etapas de purificação	Volume (mL)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,82	21,73	17,82	1.627,52	1.334,56	74,89	100,00	0
Tratamento Térmico	0,70	8,35	5,85	1.392,00	974,40	166,56	73,01	2,22
Precipitação com Etanol 60%	1,15	0,69	0,80	325,52	374,34	467,94	28,04	6,24
Precipitação com Acetona	0,50	0,56	0,28	552,00	276,00	985,71	20,64	13,16

Tabela 7: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina

Etapas de purificação	Volume (mL)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,82	21,73	17,82	29.660,16	24.321,33	1.364,83	100,00	0
Tratamento Térmico	0,70	8,35	5,85	9.968,64	6.978,04	1.192,83	28,69	0,87
Precipitação com Etanol 60%	1,15	0,69	0,80	980,64	1.127,74	1.409,67	4,63	1,03
Precipitação com Acetona	0,50	0,56	0,28	2.015,36	1.007,68	3.598,85	4,14	2,64

Metodologia 4: BBI obtido através de tratamento térmico na presença de citrato e precipitações com etanol 60% e acetona

Tabela 8: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L -BTpNA pela quimotripsina

Etapas de purificação	Volume (ml)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,9	21,14	19,02	1.563,20	1.406,88	73,96	100,00	0
Tratamento Térmico	0,83	7,99	6,63	1.380,80	1.146,06	172,85	81,46	2,33
Precipitação com Etanol 60%	1,24	0,63	0,78	342,16	424,28	543,95	30,15	7,35
Precipitação com Etanol 80%	0,50	0,70	0,35	605,28	302,64	864,68	21,51	11,69

Tabela 9: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL -BApNA pela tripsina

Etapas de purificação	Volume (mL)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,9	21,14	19,02	31.114,24	28.002,81	1.472,28	100,00	0
Tratamento Térmico	0,83	7,99	6,63	7.923,20	6.576,26	991,89	23,48	0,67
Precipitação com Etanol 60%	1,24	0,63	0,78	7.211,84	1.502,68	1.926,51	5,36	1,31
Precipitação com Etanol 80%	0,50	0,70	0,35	2.496,00	1.248,00	3.565,71	4,46	2,42

Metodologia 5: BBI obtido através de tratamento térmico com limão pH 2,5 e precipitações com etanol 60 e 80%

Tabela 10: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L-BTpNA pela quimotripsina

Etapas de purificação	Volume (ml)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,82	22,32	18,30	1.298,12	1.064,45	58,16	100,00	0
Tratamento Térmico	0,59	9,10	5,33	738,50	435,71	81,28	40,93	1,39
Precipitação com Etanol 60%	0,98	0,61	0,59	193,44	189,57	321,30	17,80	5,52
Precipitação com Etanol 80%	0,50	0,49	0,24	298,62	148,81	620,04	13,97	10,66

Tabela 11: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL-BApNA pela tripsina

Etapas de purificação	Volume (mL)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,82	22,32	18,30	37.424,98	30.688,48	1.676,96	100,00	0
Tratamento Térmico	0,59	9,10	5,33	16.552,33	9.765,87	1.821,99	31,82	1,08
Precipitação com Etanol 60%	0,98	0,61	0,59	2.499,39	2.449,02	4.150,88	7,98	2,47
Precipitação com Etanol 80%	0,50	0,49	0,24	3.278,01	1.639,00	6.829,16	5,34	4,07

Metodologia 6: BBI obtido através de tratamento térmico com limão pH 4,0 e precipitações com etanol 60 e 80%

Tabela 12: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do L-BTpNA pela quimotripsina

Etapas de purificação	Volume (ml)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,73	24,80	18,10	1.323,2	965,93	53,36	100,00	0
Tratamento Térmico	0,50	9,12	4,56	835,36	417,68	91,59	43,24	1,71
Precipitação com Etanol 60%	0,90	0,54	0,49	191,54	172,38	351,79	17,84	6,59
Precipitação com Etanol 80%	0,50	0,40	0,20	269,22	134,61	673,05	13,93	12,61

Tabela 13: Quadro de purificação de BBI baseada na inibição da hidrólise do DL-BApNA pela tripsina

Etapas de purificação	Volume (mL)	Conc. Proteínas (mg/mL)	Massa (mg)	Atividade Inibitória	Atividade total	Atividade específica	Rendimento (%)	Enriquecimento (%)
Extrato protéico	0,73	24,80	18,10	40.653,44	29.677,01	1.639,61	100,00	0
Tratamento Térmico	0,50	9,12	4,56	18.985,60	9.492,80	2.081,75	31,98	1,26
Precipitação com Etanol 60%	0,90	0,54	0,49	2.633,12	2.369,81	4.836,34	7,98	2,94
Precipitação com Etanol 80%	0,50	0,40	0,20	2.968,80	1.484,40	7.422,00	5,00	4,52

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](#)