

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**EFEITOS CITOSTÁTICOS E CITOTÓXICOS DO
INIBIDOR DE PROTEASES – BTCI – E
PEPTÍDEOS DERIVADOS EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA (MCF-7)**

GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria de Freitas

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília
2008



Dissertação de Mestrado

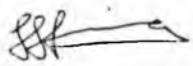
Graziella Anselmo Joanitti

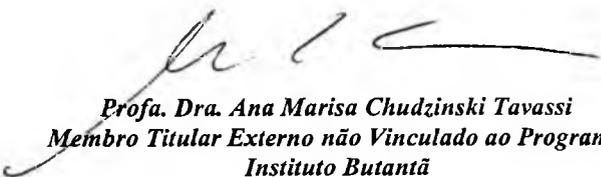
Título:

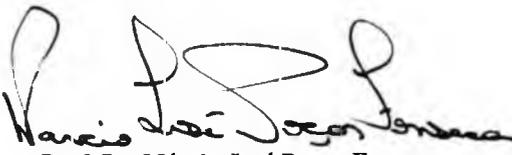
“Efeitos citostáticos e citotóxicos do inibidor de proteases – BTCI – e peptídeos derivados em células de câncer de mama (MCF - 7)”

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
Presidente / Orientador
UnB


Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa
UnB


Profa. Dra. Ana Marisa Chudzinski Tavassi
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
Instituto Butantã


Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca
Membro Suplente
Interno não Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 22 de fevereiro de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado....

Aos meus amados pais, Luis e Terezinha, que são e continuarão sendo para mim modelos de determinação, honestidade, caráter, esperança e fé. Obrigada por todo o amor, oração, apoio, ajuda, força, incentivo e carinho dados a mim ao longo de toda a minha vida.

Aos meus queridos irmãozinhos, Emmanuel e Rafaella, pela amizade, convivência diária e apoio que me deram durante a realização desse trabalho.

A todos os meus demais familiares, especialmente minha avó Virtudes e parentes biólogos tio Zezo, Lucas e Sabrina, por toda força e oração destinados a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu amor infinito e por todas as graças derramadas na minha vida.

“Tudo posso naquele que me fortalece.” (Filipenses 4, 13)

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pela agradável convivência e pela oportunidade de estagiar desde o meu primeiro semestre de Graduação em seu laboratório.

Obrigada por todos os seus preciosos ensinamentos, por seu exemplo de pesquisador e por acreditar no meu trabalho e na minha pesquisa.

A minha querida co-orientadora Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas, exemplo de responsabilidade e dedicação à pesquisa, por todo apoio, atenção, oportunidades, ensinamentos e confiança dedicadas ao meu trabalho e a mim. Obrigada por seu carinho.

A minha querida amiga Carol Valois por ser para mim um modelo de pesquisadora, de dedicação, de garra e persistência. Obrigada por todos os momentos de alegria, por seus valiosos ensinamentos, auxílios em experimentos e por me ajudar (mesmo sem saber) a superar muitas dificuldades.

Ao meu querido amigo Luciano Paulino que é para mim modelo de pesquisador, de dedicação e de superação. A você, que foi praticamente o meu primeiro orientador, agradeço por acompanhar atenciosamente o meu desenvolvimento como pesquisadora fornecendo apoio, orientação e oportunidades. Obrigada também por ser um grande amigo em meus momentos de desânimo e também de alegria.

Ao meu amado namorado, Alexandre, e toda a sua família, pelo amor, incentivo, ajuda, compreensão e apoio dedicados a mim, especialmente durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço de forma conjunta a todos os professores, amigos e colegas dos vários laboratórios que tive a oportunidade de estar:

** Laboratório de Morfologia e Morfogênese (UnB), especialmente para todos os alunos do grupo de pesquisa do Prof. Ricardo Bentes de Azevedo e para os técnicos Djalma e Felipe. Vocês são demais!!!*

** Laboratório de Biofísica (UnB), especialmente para os alunos da Profa. Sonia Maria de Freitas e para o técnico Chiquinho.*

** Laboratório de Microbiologia (UnB), especialmente para Profa. Marlene Sousa, para o grupo da Profa. Loreni Giuliano e para a técnica Marinês.*

** Laboratório de Bioquímica (UnB), especialmente para a minha amiga Michelle.*

** Laboratório de Biologia Molecular (UnB), especialmente para Luciana, Mariana e Izabel.*

** Laboratório de Microscopia Eletrônica (UnB), para os alunos do Prof. Bergmann Ribeiro e da Profa. Sonia Bao e, especialmente, para Elaine Porfirio pela simpatia, responsabilidade e fundamental ajuda no microscópio eletrônico.*

** Laboratório de Genética (UnB), especialmente para os alunos da Profa. Zulmira Lacava e a técnica Elisa.*

** Ao grupo do Prof Carlos Bloch da EMBRAPA, especialmente para Luciano e Beatriz.*

** A todos os simpáticos e inteligentes alunos da Profa. Laila Darvene do Laboratório de Farmacognosia (UnB).*

** A equipe do Prof Ruy Jaeger (Universidade de São Paulo), especialmente para Vanessa e Letícia.*

** A todos da equipe do Prof. Rui Curi (Universidade de São Paulo).*

Obrigada por toda assistência dada a essa pesquisa, exemplos de dedicação e responsabilidade, carinho, ensinamentos, amizades, alegria, força e incentivo dedicados a mim. A vocês toda a minha gratidão!

A todos os meus queridos e preciosos amigos (de infância, ensino fundamental e médio, Igreja, graduação) por torcerem pela conclusão desse trabalho e por compreenderem minhas ausências.

*Ao prof Jaime Carmine Dianese, por autorizar o uso de uma área na Estação de Biologia Experimental (UnB) para o plantio de sementes *Vigna unguiculata* utilizadas nesse estudo.*

*Agradeço, especialmente, o técnico Francisco da Estação de Biologia Experimental (UnB), por realizar, com dedicação e responsabilidade, o plantio e colheita das sementes de *Vigna unguiculata*.*

Ao prof Antônio Teixeira (UnB), por autorizar o uso do equipamento de citometria de fluxo.

A Universidade de Brasília pela oportunidade de estudo desde a Graduação.

A CAPES, ao CNPq e a FAPDF pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer que apresenta as maiores taxas de incidência e mortalidade em mulheres no Brasil e no mundo. Atualmente, os tratamentos existentes para esse tipo de câncer têm eficiência moderada e causam efeitos colaterais severos que diminuem a qualidade de vida do paciente. Dessa forma, existe uma busca constante por novos tratamentos e moléculas anticarcinogênicas eficientes e não indutoras de efeitos colaterais severos. Diversos compostos purificados de plantas têm seus efeitos anticarcinogênicos relatados na literatura. Dentre essas moléculas, destacam-se os inibidores de protease da família Bowman-Birk. O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do inibidor de proteases da família Bowman-Birk BTCl, purificado de sementes de *Vigna unguiculata*, e de peptídeos sintéticos derivados em células de câncer de mama (MCF-7), *in vitro*.

O tratamento de BTCl e do peptídeo com atividade de inibição para quimotripsina (PCHY) em células MCF-7 por 72 horas mostraram os seguintes efeitos: redução do potencial de membrana mitocondrial e da viabilidade e proliferação celular; aumento da fragmentação de DNA; condensação de cromatina; e alterações do ciclo celular, integridade da membrana plasmática e morfologia das células. Os efeitos citostáticos e citotóxicos observados no tratamento de BTCl e PCHY sugerem a indução da via de morte celular da apoptose associada a ativação do processo de autofagia. Além de seus efeitos anticarcinogênicos, outras características promissoras dessas moléculas, como elevada estabilidade (BTCl), ausência de toxicidade para fibroblastos (PCHY), solubilidade em solução aquosa e ausência de efeitos na lise de hemáceas (BTCl e PCHY), corroboram para sua potencial utilização como agentes anticarcinogênicos alternativos ou complementares aos tratamentos convencionais empregados atualmente para o câncer de mama.

ABSTRACT

Breast cancer is the type of cancer with the highest incidence and mortality rates among women in Brazil and around the world. Currently, breast cancer treatments employed have moderate efficiency and cause severe side effects which reduce the patient's life quality. Therefore, there is constant research for new and efficient treatments and anticarcinogenic molecules with low or no side effects. Several purified compounds of plants and their anticarcinogenic effects have been reported in literature. Among these compounds, the Bowman-Birk family protease inhibitors stand out. The objective of the present work was to analyze the effects of a Bowman-Birk family protease inhibitor named BTCI, extracted from *Vigna unguiculata* seeds, and of BTCI-derived peptides in breast cancer cells (MCF-7), *in vitro*.

The 72 hours treatment of BTCI and its derived peptide with chymotrypsin inhibitor properties (PCHY) showed the following results: mitochondrial membrane potential, cell viability, and proliferation reductions; DNA fragmentation increase; chromatin condensation; cell cycle, plasma membrane integrity, and morphology alterations. The cytostatic and cytotoxic effects observed in BTCI and PCHY treatments suggested the induction of apoptosis cell death associated with autophagy activation. In addition to their anticarcinogenic effects, other promising characteristics of these molecules are that they presented elevated stability (BTCI), no toxicity to fibroblasts (PCHY), aqueous solution solubility, and no induction of erythrocytes lyses (BTCI and PCHY). These additional properties contribute to their potential use as alternative anticarcinogenic agents for conventional breast cancer treatments employed at the present moment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de desenvolvimento do câncer. Iniciação: mutação genética. Promoção: transformação maligna da célula. Progressão: proliferação celular descontrolada e possível metástase. Adaptado de:

http://hs.riverdale.k12.or.us/~dthomps/exhib_03/emilty03/cancer22.gif..... 02

Figura 2. Fases do ciclo celular. Ao receber um estímulo para proliferação as células passam da fase G0 para a fase G1. Caso as condições ambientais forem favoráveis, as células vão para a fase S, onde ocorre a síntese do DNA. Após passar por outro ponto de restrição na fase G2, as células se dividem, podendo reiniciar o ciclo na presença de outro estímulo proliferativo. Adaptado de:

http://www.unipv.it/webbio/anatcomp/freitas/2006-2007/cell_cycle.jpg..... 03

Figura 3. Vias de ativação da apoptose. Para informações detalhadas consulte IGNEY et al., 2002..... 06

Figura 4. Porcentagem das principais causas de morte no Brasil. Adaptado de AICR, 2007..... 08

Figura 5. Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo Unidade de Federação. INCA, 2007..... 09

Figura 6. Estrutura geral de um inibidor de serinoproteases da família Bowman-Birk. A) Destaque para as ligações dissulfeto (amarelo) e sítios reativos para a tripsina (vermelho) e quimotripsina (verde) (PDB: 2G81). B) Inibição simultânea de duas serinoproteases por um inibidor Bowman-Birk (azul). Extraído de: <http://opm.phar.umich.edu/?images=all>..... 16

Figura 7. Estrutura do inibidor da família Bowman-Birk BTCI. A) Destaque para as ligações dissulfeto (amarelo) e sítios reativos para a tripsina (vermelho) e quimotripsina (verde) (PDB: 2G81). B) Sobreposição das estruturas do BBI clássico (amarelo, PDB: 1BBI) e BTCI (azul): identidade da sequência de resíduos de aminoácidos e sobreposição estrutural de 75 e 95%, respectivamente..... 18

Figura 8. Potenciais sítios de atuação dos inibidores de protease no processo de carcinogênese. Adaptado de JOANITTI et al., 2006..... 19

Figura 9. Publicações científicas de conteúdo original relacionando inibidores de protease da família Bowman-Birk e câncer publicados entre os anos de 1981 e 2007. Pesquisa realizada no site de pesquisa de publicações científicas PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) com as palavras: *Bowman and Birk and cancer*. Revisões, comentários e artigos não relacionados foram excluídos da contagem. 22

- Figura 10. *Vigna unguiculata*.** A) Plantação na Estação Biológica da Universidade de Brasília. B) Vagem jovem. C) Vagem madura. D) Sementes maduras. Barra = 1 cm..... **32**
- Figura 11.** Purificação do inibidor de proteases BTCI por cromatografia de troca iônica a partir do extrato bruto obtido de sementes de *Vigna unguiculata*. O BTCI foi eluído entre as frações 160 e 180..... **53**
- Figura 12.** Avaliação do grau de pureza de BTCI. O espectro de MALDI-TOF/MS mostra os picos de 9105,926 e de 4551,743 Da correspondentes às massas do BTCI e do BTCI duplamente ionizado, respectivamente..... **54**
- Figura 13.** Atividade inibitória de BTCI e dos peptídeos derivados do mesmo, PCHY e PTRY. A) Atividade residual de tripsina. B) Atividade residual de quimotripsina..... **56**
- Figura 14.** Viabilidade de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI e peptídeos derivados, PCHY e PTRY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. Ensaio de viabilidade por MTT. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ **57**
- Figura 15.** Número de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ **58**
- Figura 16.** Ciclo celular de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ **59**
- Figura 17.** Fragmentação de DNA de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ **60**
- Figura 18.** Morfologia do núcleo de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI ou PCHY após 72 horas de incubação. A) Grupo controle. B) 200 μM de BTCI. C) 400 μM de SCHY. Legendas: nucléolo (cabeça de seta); condensação da cromatina (seta); células menores que o controle (*). Barra: 30 μm **61**

Figura 19. Potencial de membrana mitocondrial de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ 62

Figura 20. Integridade da membrana plasmática de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ 63

Figura 21. Fotomicrografias de células de câncer de mama (MCF-7) na presença do inibidor de proteases BTCl ou de PCHY após 72 horas de incubação. A) Grupo controle . B) 200 μM de BTCl. C) 400 μM de PCHY D) 400 μM BSA. Seta: agregação protéica. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase. Barra = 30 μm 64

Figura 22. Ultraestrutura de células de câncer de mama (MCF-7) na presença de BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação. A, C e E) Grupo controle. B, D e F) 200 μM de BTCl ou 400 μM de PCHY. N: núcleo; EN: envoltório nuclear; FN: fragmentação nuclear; M: mitocôndria; L: lisossomo; F: fragmentos celulares; ML: membrana plasmática lesionada..... 66

Figura 23. Ultraestrutura de células de câncer de mama (MCF-7) na presença de BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação. Presença de estruturas envolvidas no processo de autofagia. N: núcleo; M: mitocôndria; L: lisossomo; *: autofagossomos; seta: fragmentos de membranas desorganizados..... 67

Figura 24. Relação de granulidade (SSC) e tamanho (FSC) de células de câncer de mama (MCF-7) na presença de BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação. A) Grupo controle. B) 200 μM de BTCl. C) 400 μM de PCHY. D) 400 μM de BSA. E) Representação gráfica das figuras A, B, C, D. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ 68

Figura 25. Efeitos de BTCl ou de PCHY na lise de hemácias. Controle positivo: Triton-X 100 1%. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ 69

Figura 26. Efeitos de BTCl ou de PCHY na viabilidade de fibroblastos. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$ 70

Figura 27. Efeitos do BTCl ou de PCHY no pH do meio de cultura..... 70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Câncer	
1.1.1 Aspectos Gerais	01
1.1.2 Proliferação Celular	02
1.1.3 Morte Celular	05
1.2 Câncer de Mama	
1.2.1 Incidência e mortalidade no Brasil e no mundo	07
1.2.2 Aspectos Gerais e Tratamentos	09
1.2.3 Eficiência dos tratamentos atuais para câncer e busca de novas alternativas	12
1.3 Inibidores de Protease	
1.3.1 Aspectos Gerais	14
1.3.2 Família Bowman-Birk	15
1.3.3 Inibidores de protease como agentes anticarcinogênicos	18
1.3.3.1 Atuação na transformação maligna	19
1.3.3.2 Atuação nos processos de crescimento, vascularização e metástase	20
1.4 Peptídeos Derivados de Moléculas Naturais	23
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Equipamentos, materiais e reagentes utilizados	29
4.2 Desenho Experimental	31
4.3 Purificação de BTCl	32
4.3.1 Obtenção de sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	32
4.3.2 Preparação de Extrato Bruto	33
4.3.3 Cromatografia de troca iônica	34

4.3.4 Análise da pureza da amostra	35
4.4 Obtenção dos Peptídeos derivados de BTCl	35
4.5 Atividade inibitória de BTCl e de peptídeos derivados	35
4.5.1 Ensaio de inibição de tripsina	35
4.5.2 Ensaio de inibição de quimotripsina	36
4.6 Cultura de células	37
4.6.1 Linhagens Celulares	37
4.6.2 Manutenção da cultura de células	38
4.7 Preparação das amostras de BTCl, PTRY e PCHY para o tratamento das células	39
4.8 Tratamento das células com BTCl e peptídeos derivados	40
4.9 Análise de efeitos citostáticos.....	43
4.9.1 Proliferação Celular.....	43
4.9.2 Ciclo Celular.....	43
4.10 Análise de efeitos citotóxicos	44
4.10.1 Viabilidade Celular.....	44
4.10.2 Fragmentação de DNA.....	45
4.10.3 Morfologia do Núcleo	46
4.10.4 Potencial de Membrana Mitocondrial	46
4.10.5 Integridade da Membrana Plasmática	47
4.10.6 Morfologia Celular	48
4.10.6.1 Microscopia de contraste de fase	48
4.10.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão	49
4.10.6.3 Determinação de tamanho e granulosidade celular	50
4.11 Ensaio Hemolítico	50
4.12 Determinação do pH do meio de cultura	51
4.13 Análise estatística	51
5. RESULTADOS	53
5.1 Purificação e pureza de BTCl.....	53
5.2 Atividade inibitória de BTCl e de peptídeos	

derivados em serinoproteases	55
5.3 Viabilidade celular de células MCF-7 na presença de BTCI e de peptídeos derivados	57
5.4 Efeitos de BTCI e PCHY na proliferação de células MCF-7	58
5.5 Material genético e morfologia nuclear de células MCF-7 na presença de BTCI ou PCHY	60
5.6 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células MCF-7 na presença de BTCI ou PCHY	62
5.7 Integridade da membrana plasmática de células MCF-7 na presença de BTCI ou PCHY	63
5.8 Morfologia de células MCF-7 na presença de BTCI ou PCHY	64
5.9 Efeitos de BTCI ou PCHY em células não tumorais	68
5.10 pH do meio de cultura na presença de BTCI ou de PCHY	70
5.11 Quadro resumo dos resultados do tratamento de BTCI e PCHY em células MCF-7 e não tumorais	71
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÕES	90
8. ANEXO	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

1.1.1 Aspectos Gerais

O câncer é caracterizado por desordens celulares desencadeadas em função de mutações adquiridas no material genético. Essas mutações podem ser causadas por fatores genéticos e/ou ambientais, culminando em alterações como a proliferação celular descontrolada e a invasão dessas células para outros tecidos do corpo. É uma patologia heterogênea que ocorre em diversos tipos celulares.

Cerca de 5 a 10% dos cânceres são derivados de oncogenes hereditários. O restante dos cânceres envolvem alterações ou danos no material genético das células que são acumulados ao longo do tempo (AICR, 2007). Devido a uma série de alterações genéticas e epigenéticas, uma vasta combinação de mutações terminam por desencadear outras patologias, tornando a cura do câncer um importante desafio para a medicina (WEINBERG, 2007).

Em geral, o desenvolvimento do câncer ocorre lentamente, podendo formar um tumor apenas muitos anos após a exposição ao agente carcinogênico. Esse processo é classicamente dividido em três estágios principais: a iniciação, promoção e progressão (Figura 1). No estágio de iniciação, as células apresentam alterações genéticas em decorrência da exposição ao agente carcinogênico, no entanto, ainda não é possível identificar o tumor clinicamente. No estágio de promoção, a célula afetada inicia, lentamente, o processo de transformação maligna caracterizado pela expressão de oncogenes. Por fim, o estágio de progressão caracteriza-se pela proliferação

descontrolada e irreversível das células formando uma massa tumoral no local. Nesse último estágio algumas células podem entrar em metástase, ou seja, invadir a corrente sanguínea e se instalar em outros tecidos do organismo (BRENTANI et al., 2003).

Alterações em vias de transdução de sinal, importantes na regulação do ciclo celular e da sobrevivência da célula, são obrigatórios para o estabelecimento de todos os tipos tumorais. Dessa forma, essas duas vias constituem dois pilares em comum para o estabelecimento e desenvolvimento do câncer (EVAN et al., 2001).

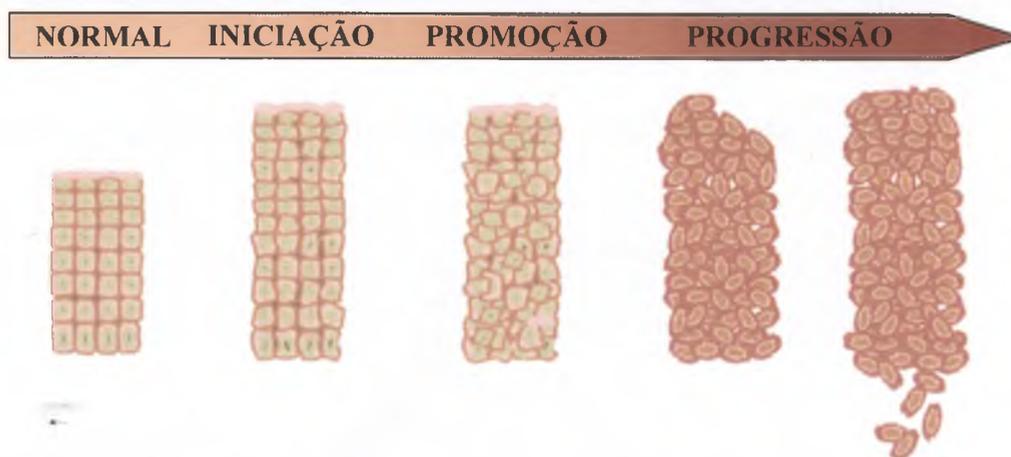


Figura 1. Estágios de desenvolvimento do câncer. Iniciação: mutação genética. Promoção: transformação maligna da célula. Progressão: proliferação celular descontrolada e possível metástase. Adaptado de: http://hs.riverdale.k12.or.us/~dthomps0/exhib_03/emilty03/cancer22.gif.

1.1.2 Proliferação Celular

O ciclo celular de uma célula normal é composto por quatro fases principais (Figura 2): G1 (síntese protéica e RNA), S (replicação do DNA), G2 (final da replicação do DNA e síntese protéica) e M (mitose). Além dessas fases, existe a fase G0 onde a

célula não prossegue no ciclo e fica em um estado quiescente, podendo retornar ao mesmo após receber estímulos para a proliferação (MOLINARI, 2000).

O ciclo celular possui dois pontos de checagem principais entre as fases G1/S e G2/M. Esses pontos têm a finalidade de verificar se a célula em divisão apresenta tamanho adequado, nutrientes suficientes e nenhuma alteração na replicação do DNA. Erros durante a replicação do DNA ocorrem, mas em sua maioria são reconhecidos e reparados pela maquinaria celular. No entanto, caso não seja possível reparar o erro, vias de transdução de sinal induzem o bloqueio no ciclo celular e a morte da célula por apoptose. Esses mecanismos previnem a propagação de mutações ao longo das gerações da célula impedindo a formação de tumores (HANAHAN, 2000).

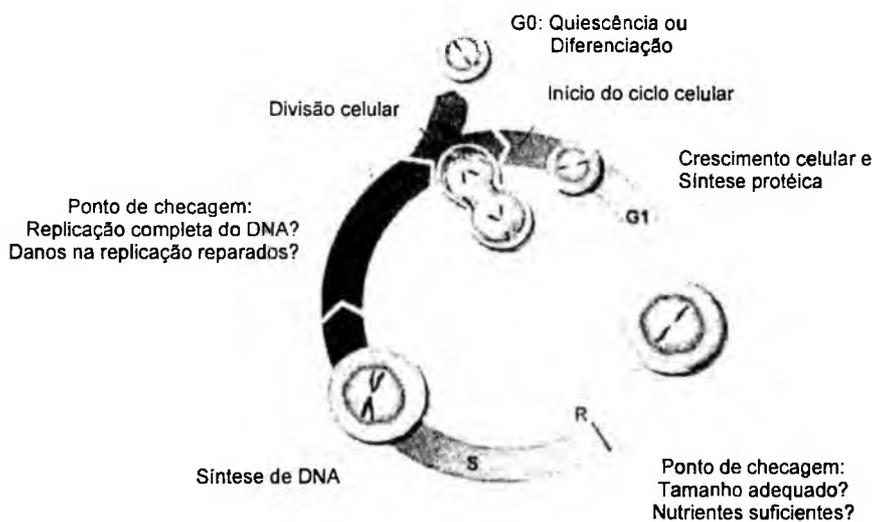


Figura 2. Fases do ciclo celular. Ao receber um estímulo para proliferação as células passam da fase G0 para a fase G1. Caso as condições ambientais sejam favoráveis, as células vão para a fase S, onde ocorre a síntese do DNA. Após passar por outro ponto de checagem na fase G2, as células se dividem, podendo reiniciar o ciclo na presença de outro estímulo proliferativo. Adaptado de: http://www.unipv.it/webbio/anatcomp/freitas/2006-2007/cell_cycle.jpg.

O ciclo celular é finamente regulado por moléculas indutoras e inibitórias que são ativadas ou degradadas dependendo da fase de progressão do mesmo. Diferentes ciclinas juntamente com quinases ciclina-dependentes (Cdk) formam complexos, de forma ordenada e sequencial, controlando a passagem das células ao longo das fases do ciclo. Em cada uma das fases, as atividades dos complexos Cdk-ciclina são reguladas por inibidores específicos (MOLINARI, 2000; DESHPANDE et al., 2005).

Células tumorais apresentam diversas alterações na regulação do ciclo celular. Elas proliferam independentemente de um estímulo adequado. Essa característica pode ocorrer devido a modificações do fator de crescimento (estimulação autócrina, por exemplo), aumento na expressão e produção de receptores para fatores de crescimento ou mutações ocorridas nas vias de transdução do sinal de proliferação (HANAHAN, 2000; VERMEULEN et al., 2003; MALUMBRES, 2007).

Moléculas reguladoras da transição da célula entre as fases do ciclo celular têm sua expressão e produção significativamente alteradas em células tumorais. Assim, as células conseguem prosseguir no ciclo celular mesmo apresentando mutações em seu material genético, pois também diminuem a atividade da maquinaria de reparo de DNA (MOLINARI, 2000; WYMAN et al., 2006; MALUMBRES, 2007).

Células tumorais também modulam outros aspectos da proliferação celular. O processo de replicação de células diplóides normais tem seu número de divisões controlado, ocorrendo apenas de 60 a 70 vezes. Ao atingir esse limite, as células são induzidas à senescência e depois à morte. O número definido de divisões é determinado pela extensão dos telômeros localizados na porção final dos cromossomos, que diminuem a cada ciclo celular. Entretanto, em células tumorais, a extensão dos telômeros é estabilizada pelo aumento na expressão de telomerase,

mantendo assim um número infinito de replicações (DESMAZE et al., 2003; CHEUNG et al., 2008).

1.1.3 Morte Celular

A apoptose é um processo biológico de morte celular essencial para a homeostase de um organismo. Também está envolvida na maquinaria de defesa do sistema imune e tem um papel fundamental na proteção do organismo contra a carcinogênese (FESIK, 2005; GHOBRIAL et al., 2005; JIN et al., 2005). Consiste na autodestruição programada e controlada de uma célula mediante a um estímulo de morte celular (dano no material genético ou restrição energética, por exemplo). Em um sistema vivo, os fragmentos celulares são fagocitados por células próximas sem causar reações inflamatórias no local (OKADA, 2004).

A célula apoptótica tem como algumas características a perda do volume, condensação da cromatina, degradação do DNA e formação de corpos apoptóticos (fragmentos celulares envoltos por membrana plasmática) (MAJNO et al., 1995). Essas alterações ocorrem em função da regulação de vias de transdução de sinal envolvendo proteínas anti- e pro-apoptóticas, seguida pela degradação proteolítica de componentes celulares (YOULE et al., 2008).

Caspases são as principais enzimas participantes do processo de ativação da apoptose. Elas clivam substratos vitais da células causando alterações bioquímicas e morfológicas características desse processo de morte celular (GHOBRIAL et al., 2005). A clivagem da lâmina nuclear causa a condensação da cromatina e diminuição do volume do núcleo. A desativação de inibidores de endonucleases induzem a

fragmentação do DNA. Proteínas do citoesqueleto também são clivadas pelas caspases induzindo alterações na morfologia (SAVILL et al., 2000).

A apoptose pode ser ativada por duas vias principais (Figura 3). A via extrínseca inicia-se com a interação de ligantes específicos aos receptores de apoptose localizados na superfície da membrana plasmática desencadeando a ativação de caspases. A via intrínseca é iniciada após alterações funcionais e/ou estruturais ocorridas na mitocôndria desencadeando a liberação de moléculas sinalizadoras responsáveis por ativar as caspases (IGNEY et al., 2002).

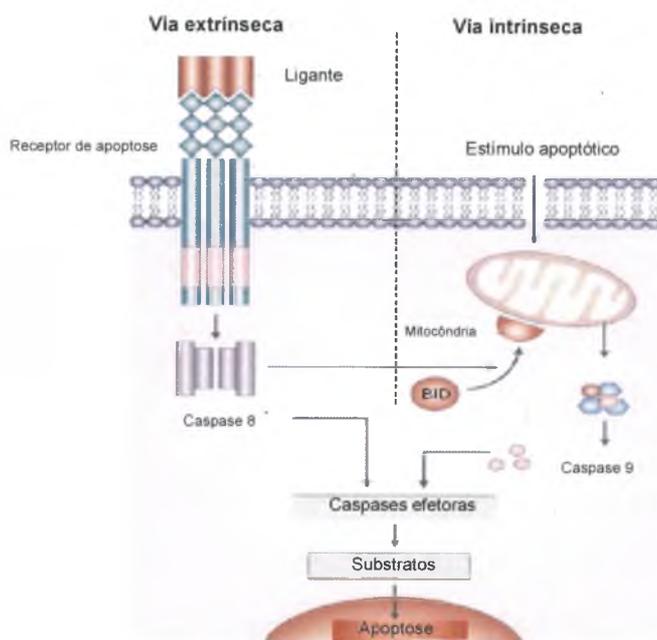


Figura 3. Vias de ativação da apoptose.
Adaptado de IGNEY et al., 2002.

Alterações no material genético, aumento na expressão de oncogenes e em fatores de crescimento induzem a célula à apoptose. No entanto, células tumorais,

apesar de apresentarem danos no material genético, conseguem alterar a sinalização da apoptose e prosseguir na via de proliferação celular (FESIK, 2005; GHOBRIAL et al., 2005; JIN et al., 2005). A via de sinalização da proteína P53, dentre outras funções, articula a expressão e atividade de moléculas bloqueadoras do ciclo celular e a indução da apoptose. Essa via é bloqueada em aproximadamente 50% dos tipos de câncer que, dessa forma, impedem a ativação da mesma (CHIPUK et al, 2006).

Destacam-se como outros mecanismos de resistência à apoptose presentes no câncer: o aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas e mutação/supressão das pró-apoptóticas, além de alterações na expressão de receptores transmembrana sinalizadores de apoptose fazendo com que a célula não seja reconhecida por linfócitos e escape da morte induzida pelo sistema imune (IGNEY et al., 2002).

1.2 CÂNCER DE MAMA

1.2.1 Incidência e mortalidade no Brasil e no mundo

O câncer está incluído entre as principais causas de morte mundial. Dados mundiais para o ano de 2002 estimaram a incidência de aproximadamente 11 milhões de novos casos, 7 milhões de mortes e 25 milhões de pessoas vivendo com câncer (PARKIN et al., 2005). Boletins publicados pela Organização Mundial da Saúde mostram que de um total de 58 milhões de mortes em todo o mundo em 2005, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, ou seja, 13 %. Estima-se que, em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões (WHO – World Cancer Report, 2003).

O Brasil apresenta significativas taxas de incidência e mortalidade por câncer. Essa patologia está entre as principais causas de morte por doenças no país, ocupando o segundo lugar (Figura 4) (AICR, 2007). As estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer (INCA, 2007).

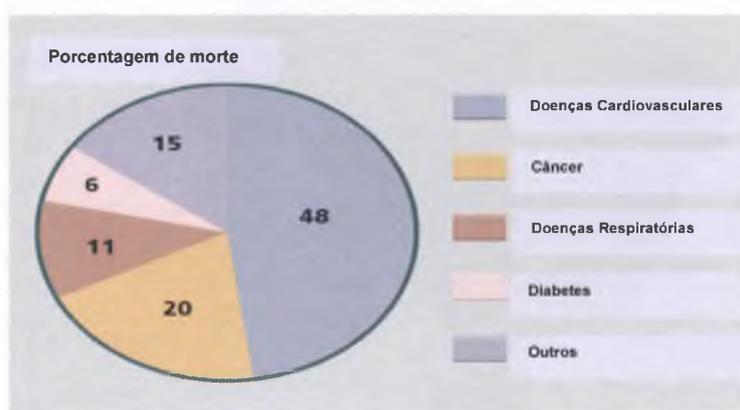


Figura 4. Porcentagem das principais causas de morte por doenças no Brasil. Adaptado de AICR, 2007.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo. Estimativas registraram, para o ano de 2002, aproximadamente 1,15 milhões de novos casos, com previsão de 1,5 milhões de casos para 2010 (PARKIN et al., 2005). Suas taxas de mortalidade ocupam o quinto lugar em relação a todos os tipos de câncer (14%). Entre as mulheres, o câncer de mama é o tipo de cancer mais frequente (23%) e responsável pela maior taxa de mortalidade com relação a outros tipos de câncer (PARKIN et al., 2005; AICR, 2007).

No Brasil, as taxas de incidência e mortalidade desse tipo de câncer apresentam o mesmo perfil mundial. O número de novos casos de câncer de mama esperados para

o ano de 2008 é de 49.400. A incidência do câncer de mama ocorre principalmente nas regiões Sudeste, Sul, e Centro-Oeste (Figura 5). Entre as capitais, Brasília ocupa o quinto lugar de maior incidência desse tipo de câncer (INCA, 2006), com estimativa de 660 novos casos para o ano de 2008 (INCA, 2007).

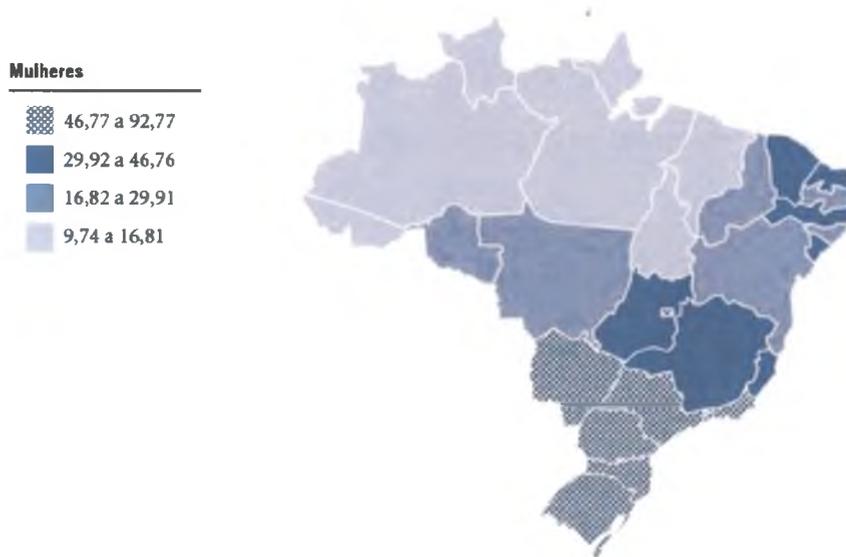


Figura 5. Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo Unidade de Federação. INCA, 2007.

1.2.2 Aspectos Gerais e Tratamentos

O tecido mamário constitui-se basicamente de gordura, tecido conjuntivo e tecido glandular. Esse tecido age em resposta a hormônios como estrógeno, progesterona, insulina e fatores de crescimento. Seu desenvolvimento ocorre principalmente nos períodos da puberdade, gravidez e lactação. Após a menopausa, ocorre a atrofia do tecido (AICR, 2007).

O câncer de mama é caracterizado por uma proliferação descontrolada de células das glândulas mamárias. Durante o processo de metástase as células malignas são freqüentemente encontradas em nódulos linfóides próximos a mama, mas que também podem se instalar em ossos, fígado, pulmões e cérebro. Os principais sintomas de câncer de mama são: presença de nódulos que persistem ao longo de todo o ciclo menstrual; diferentes formas e sensibilidade da mama e secreções do mamilo (NIH, 2005). Apesar de raro, esse tipo de câncer também pode ocorrer em homens (GIORDANO et al., 2004).

Os fatores de risco para o câncer de mama não são bem conhecidos. Apesar disso, pesquisadores identificaram características comuns entre mulheres que desenvolvem a doença. Cerca de 4 a 9% dos casos de câncer de mama são hereditários e geralmente causados pela mutação nos genes das proteínas BRCA1 e BRCA2 (AICR, 2007). Os fatores de risco atribuídos para o restante dos casos são: idade acima de 60 anos; histórico familiar da doença; cor de pele branca; falta de atividade física; excesso de peso; dieta; hormônios exógenos (contraceptivos e terapia de reposição hormonal); menarca precoce; menopausa tardia; nuliparidade; primeira gravidez tardia (acima dos 30 anos) e consumo de álcool e tabaco (BOFFETTA et al., 2006; AICR, 2007; LESTER et al., 2007).

O exame clínico das mamas e a mamografia são os métodos mais recomendados para o diagnóstico precoce da doença. Quando detectado em estágios iniciais, o câncer de mama apresenta um bom prognóstico com taxa de sobrevivência de 65%. Apesar disso, no Brasil, as taxas de mortalidade por esse tipo de câncer continuam elevadas, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados (INCA, 2007).

Os tratamentos mais utilizados atualmente são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal e a imunoterapia. A aplicação dos tratamentos varia de acordo com o estágio de desenvolvimento e localização do tumor.

A cirurgia consiste na remoção total ou parcial da mama e de nódulos linfáticos adjacentes, podendo causar diversos efeitos colaterais como: diminuição da auto-estima devido à mutilação do órgão; fraqueza no braço adjacente a cirurgia e suor nas mãos (NIH, 2005).

A radioterapia é um tratamento não-invasivo indicado principalmente para pacientes submetidas à cirurgia visando evitar a recorrência do tumor. Tal terapia utiliza raios X ou gamma com alta energia que são direcionados para o local do tumor/cirurgia. A energia empregada deve ser alta o suficiente para causar danos que garantam a eliminação de todas as células tumorais. No entanto, essa radiação também incide em células normais (BUCCI et al., 2005). Os principais efeitos colaterais são secura e vermelhidão na área tratada e cansaço após o tratamento (NIH, 2005).

A quimioterapia consiste no uso de drogas aplicadas endovenosamente que atingem preferencialmente células com elevadas taxas de mitose, ou seja, as células cancerígenas. No entanto, outras células normais do organismo com elevadas taxas de mitose também são afetadas (WEINBERG, 2007). Os efeitos colaterais desse tratamento variam de acordo com o tipo de droga utilizada. Alguns efeitos consistem: na morte de células sanguíneas, alopecia (queda de cabelo), alterações gastrintestinais (náuseas, vômito e diarreia), perda de apetite e infertilidade (NIH, 2005).

A terapia hormonal consiste na diminuição da produção de hormônios importantes para o desenvolvimento da célula tumoral, como o estrogênio. Aproximadamente 50 a 70% das mulheres com câncer de mama apresentam células

com expressão de receptores de estrógeno aumentada (WEINBERG, 2007). Os principais medicamentos de escolha são moduladores da expressão de receptores ou da síntese de estrógeno (LESTER et al., 2007). Alguns efeitos colaterais desse tratamento são: náuseas, irregularidade nos períodos menstruais, alterações do endométrio, diminuição do libido, dores de cabeça, calores intensos e vagina ressecada (NIH, 2005).

A imunoterapia baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais específicos contra proteínas de células tumorais, auxiliando o sistema imune no combate contra as células cancerígenas. Dores de cabeça, febres, náuseas, diarréias, danos no coração e pulmão são alguns dos efeitos colaterais da terapia (NIH, 2005).

1.2.3 Eficiência dos tratamentos atuais para câncer e busca de novas alternativas

Aproximadamente 60% dos pacientes submetidos a tratamentos com radioterapia, cirurgia e quimioterapia (realizados em combinação) apresentam chances de cura (BURNET et al., 2000). Os tratamentos que utilizam quimioterapia e radioterapia matam células tumorais induzindo apoptose. No entanto, poucos cânceres são sensíveis a essas terapias devido a desconexões existentes na via apoptótica, e terminam por adquirir resistência ao tratamento (IGNEY et al., 2002). No tratamento de tumores de mama com o quimioterápico doxorubicina, a resistência foi observada pouco tempo após o início de tratamento (AAS et al., 1996). A resistência à morte celular é um dos principais problemas enfrentados no tratamento do câncer hoje (GONZALEZ-ANGULO et al., 2007).

Apesar do desenvolvimento de novas técnicas para a utilização mais eficaz das terapias citadas, efeitos colaterais severos, como citados no item 1.2.2, contribuem para o aumento significativo das taxas de morbidade nos pacientes. Atualmente, há uma intensa busca por moléculas potencialmente efetivas contra o desenvolvimento do câncer e não-indutoras de efeitos colaterais severos.

Aproximadamente, um quarto de todos os medicamentos fabricados e consumidos hoje possuem substâncias derivadas de plantas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, de 252 medicamentos considerados básicos e essenciais, 11% são exclusivamente extraídos de plantas e outra importante proporção são derivados de precursores naturais extraídos de plantas (RATES, 2001). As plantas têm sido descritas como uma das principais fontes de novas moléculas anticarcinogênicas. Substâncias anticarcinogênicas já empregadas na clínica como etoposide e vimblastina foram purificados de *Podophyllum peltatum* e *Vinca rosea*, respectivamente (NEWMAN et al., 2000).

A importância de compostos extraídos de plantas chamou a atenção do Instituto Nacional do Cancer dos EUA que, entre 1960 e 1982, realizaram testes anticarcinogênicos com mais de 35.000 amostras de plantas (MANN, 2002). Apesar do potencial efeito citotóxico desses compostos contra células de câncer, muitos deles ainda apresentam efeitos colaterais severos (MORTIMER et al., 1999; CELLA et al., 2006). Sendo assim, a busca por novas moléculas anticarcinogênicas extraídas de plantas ainda continua. Plantas consumidas normalmente na dieta dos seres humanos contém diversas moléculas com potencial anticarcinogênico com chances de não causar efeitos colaterais severos (KENNEDY, 1998 a).

Evidências epidemiológicas indicam que o consumo de plantas da família Leguminosae (feijões, ervilhas, soja) estão associados a baixas taxas de incidência e mortalidade por câncer, especialmente para os cânceres de mama, cólon e próstata (KENNEDY, 1998 a). Dentro desse contexto, moléculas purificadas de sementes de plantas da família Leguminosae, com destaque para os inibidores de protease, têm sido investigadas (KENNEDY, 1998 b; KELLOF et al., 2000).

1.3 INIBIDORES DE PROTEASE

1.3.1 Aspectos Gerais

Inibidores de protease são encontrados em microorganismos, plantas e animais. Eles apresentam um importante papel na regulação de vias metabólicas onde proteases são um dos principais componentes. Nas plantas, inibidores de protease são comumente descritos como componentes importantes na defesa contra ataques de predadores e infecções por microorganismos, ambos associados à atividade de proteases (CARLINI et al., 2002). Em vertebrados, os inibidores de protease têm um papel na manutenção da homeostase do organismo regulando proteases do sistema imune, da cascata de coagulação, da matriz extracelular, da digestão de alimentos, da embriogênese e do sistema nervoso. As proteases inibidas estão geralmente relacionadas a vias dependentes de atividade proteolítica e transdução de sinal, como as vias reguladoras de degradação tecidual, de apoptose, de proliferação e de viabilidade celular e de expressão gênica (JOANITTI et al., 2006).

Inibidores de protease naturais foram classificados em mais de 30 famílias diferentes (RAWLINGS et al., 2004). Não existe um consenso na escolha do nome mais apropriado para descrever os inibidores, mas a maioria dos autores prefere agrupá-los de acordo com suas proteases alvo. Portanto, os grupos e famílias de inibidores são nomeados de acordo com o principal elemento envolvido no sítio catalítico de suas proteases alvo, como exemplo, os inibidores de serino-, cisteino-, aspártico- ou metallo-proteases (LASKOWSKI et al., 2000).

Os inibidores de serinoproteases apresentam um sítio reativo exposto que é mantido em uma conformação similar àquela do substrato das enzimas que eles inibem, sendo tal conformação estabilizada por ligações dissulfeto (LASKOWSKI et al., 2000). Sabendo-se que os inibidores de serinoproteases são amplamente distribuídos na natureza, e considerando-se suas características estruturais e funcionais, eles foram divididos em diversas famílias, dentre as quais destaca-se a família Bowman-Birk.

1.3.2 Família Bowman-Birk

Membros da família Bowman-Birk são abundantemente encontrados em sementes de plantas da família Leguminosae (Qi et al., 2005). O nome dessa família de inibidores faz referência aos primeiros pesquisadores a isolarem e caracterizarem um de seus membros: BOWMAN (1946) e BIRK (1963).

Os inibidores de proteases da família Bowman-Birk (IPBBIs) são moléculas pequenas apresentando de 60 a 90 resíduos de aminoácidos e 8 a 10 kDa de massa

molecular. Em sua maioria, os IPBBIs inibem principalmente tripsina e quimotripsina (serinoproteases). Apresentam uma rede de ligações dissulfeto (5 a 7 ligações) que confere maior estabilidade e rigidez às moléculas (CLEMENTE et al., 2006).

Adicionalmente, as ligações dissulfeto conferem um padrão simétrico ao inibidor onde dois sítios reativos estão localizados em regiões opostas na molécula. Esses sítios podem ser utilizados simultaneamente, permitindo que o inibidor atue sobre duas proteases alvo ao mesmo tempo (Figura 6), sem mudança significativa da estrutura do inibidor. Os sítios reativos adotam uma conformação canônica que é similar ao substrato da protease (BODE et al., 2000). Ligações não-covalentes levam à inativação da protease após a interação da mesma com o inibidor (CLEMENTE et al., 2006). Recentemente, foram identificados inibidores da família Bowman-Birk com apenas um sítio reativo (QI et al., 2005).

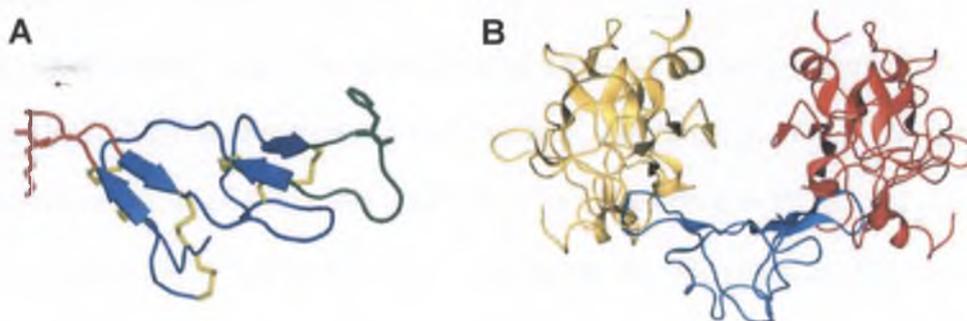


Figura 6. Estrutura geral de um inibidor de serinoproteases da família Bowman-Birk. A) Destaque para as ligações dissulfeto (amarelo) e sítios reativos para a tripsina (vermelho) e quimotripsina (verde) (PDB: 2G81). B) Inibição simultânea de duas serinoproteases por um inibidor Bowman-Birk (azul). Extraído de: <http://opm.phar.umich.edu/?images=all>.

Um dos membros mais estudados dessa família é o Bowman-Birk Inhibitor (BBI), também denominado de “BBI clássico” (QI et al, 2005). O BBI é um inibidor purificado

de sementes de soja (*Glycine max*), com baixa massa molecular (aproximadamente 8 kDa) e alta estabilidade em diferentes condições de temperatura e pH. Esse inibidor é formado por uma cadeia de 71 resíduos de aminoácidos com sete ligações dissulfeto (BIRK, 1985).

Além do BBI, outros membros dessa família já foram purificados de diferentes leguminosas e caracterizados estrutural e funcionalmente. *Black-eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor* (BTCI) é um IPBBI purificado de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) por VENTURA e XAVIER (1966). É uma proteína globular de cadeia única com 83 resíduos de aminoácidos (MORHY e VENTURA et al., 1987). Estudos relacionados à determinação de aspectos termodinâmicos e estruturais do BTCI vêm sendo realizados extensivamente (FACHETTI et al., 1984; FREITAS et al., 1997; FREITAS et al., 1999; SILVA et al., 2005; BARBOSA et al., 2007). É uma molécula que apresenta sete ligações dissulfeto e dois sítios reativos diferentes e independentes responsáveis pela inibição de quimotripsina e tripsina, respectivamente (XAVIER-FILHO et al., 1988). Além disso, é considerado estável, mantendo sua atividade de inibição em temperaturas de até 95°C e em uma variação de pH de 3 a 11 (SILVA et al., 2000). O BTCI é estrutural e funcionalmente semelhante ao BBI clássico (Figura 7). Segundo cálculos realizados em um servidor de análise de proteínas (SSAP Server, 2008), comparações da identidade de sequência de aminoácidos e da sobreposição estrutural entre BBI clássico e BTCI são de 75% e 95% respectivamente.

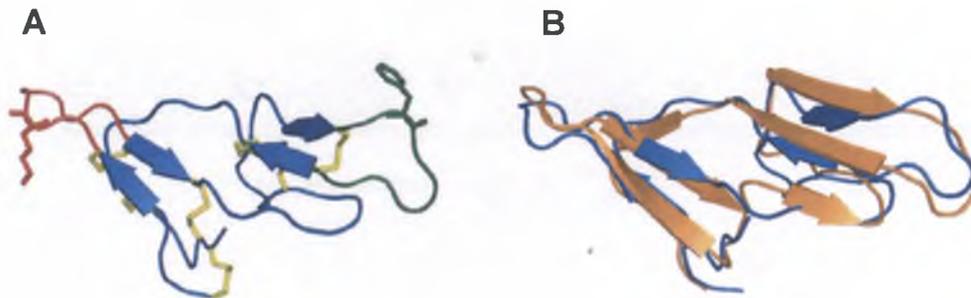


Figura 7. Estrutura do inibidor da família Bowman-Birk BBI. A) Destaque para as ligações dissulfeto (amarelo) e sítios reativos para a tripsina (vermelho) e quimotripsina (verde) (PDB: 2G81). B) Sobreposição das estruturas do BBI clássico (amarelo, PDB: 1BBI) e BTCl (azul): identidade da sequência de resíduos de aminoácidos e sobreposição estrutural de 75 e 95%, respectivamente (SSAP Server, 2008).

1.3.3 Inibidores de protease como agentes anticarcinogênicos

Os inibidores de protease estão relacionados a múltiplas aplicações potenciais em áreas econômicas e médicas (FEAR, 2007; PANDEY et al., 2007). Nas últimas décadas, a aplicação dos inibidores de protease têm sido estudada em contextos como a agricultura, doenças do sistema imune, infecções por microorganismos e vírus, hemostasia e câncer (JOANITTI et al., 2006).

Esses inibidores são agentes potenciais para atuar em diversas etapas da carcinogênese, como na transformação maligna, na atividade proteolítica alterada, na angiogênese, no crescimento tumoral e na metástase (Figura 8) (JOANITTI et al., 2006).

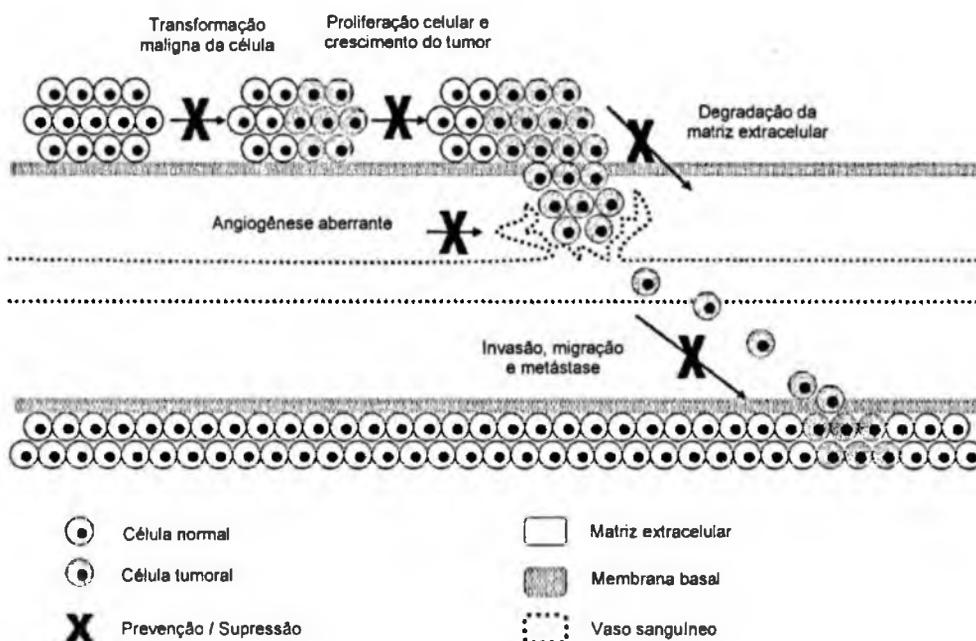


Figura 8. Potenciais sítios de atuação dos inibidores de protease no processo de carcinogênese. Adaptado de JOANITTI et al., 2006.

1.3.3.1 Atuação na transformação maligna

Diversos inibidores de protease naturais foram descritos como agentes importantes para a prevenção da transformação maligna celular (KENNEDY, 1998 b; BURTON et al., 1999). Proteases apresentam papel central na regulação da expressão gênica. Vários trabalhos têm indicado que inibidores de protease naturais interrompem o processo de transformação maligna revertendo a expressão de proto-oncogenes (*c-myc*, *c-fos*) (ST CLAIR et al., 1991; DITTMANN et al., 2003). A proteína c-Fos, por exemplo, está envolvida na regulação de diversos genes de proteases como a

colagenase e metalloproteases relacionadas ao processo da metástase (HU et al., 1994).

A transformação maligna da célula também pode ocorrer no tratamento de radioterapia. Experimentos mostram que inibidores de protease naturais podem atuar como agentes protetores para células normais expostas a radiação durante o tratamento com radioterapia (GUEVEN et al., 1998; DITTMANN et al., 2003; DITTMANN et al., 2005). Adicionalmente, esses inibidores também previnem a queda de cabelo e a perda de peso dos animais submetidos a esse tratamento (KENNEDY, 1998b).

1.3.3.2 Atuação nos processos de crescimento, vascularização e metástase

A angiogênese é um processo caracterizado pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes. A angiogênese acentuada ocorre no câncer para que o tumor mantenha um suporte nutricional adequado diante sua alta taxa de proliferação. Além disso, está relacionada a “rotas de escape” para células metastáticas (SCHNEIDER et al., 2005; FEAR, 2007). Esse processo é regulado por diversos fatores, dentre eles, enzimas proteolíticas como as serino e as metalloproteases (FOX et al., 2001; NOEL et al., 2004).

Nessa patologia, a expressão acentuada de proteases em células tumorais estimula o crescimento celular e a metástase (KOBILINSKI et al., 2000; GOLUBKOV et al., 2007), atuando na degradação e remodelamento da matriz extracelular e

desempenhando papel importante na regulação e processamento de receptores de membrana relacionados ao crescimento tumoral (NYBERG et al., 2006; JOYCE et al., 2004).

Nesse contexto, inibidores de protease naturais podem ser utilizados como agentes efetivos na inibição de proteases envolvidas nos processos da carcinogênese descritos acima. Estudos demonstram que a utilização desses inibidores em células tumorais pode suprimir não só a metástase, mas também o crescimento tumoral e a neovascularização (NOEL et al., 1998; FEAR, 2007).

Os IPBBIs são moléculas potencialmente importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos preventivos e terapêuticos contra o câncer (FERNANDES et al., 1995; KENNEDY, 1998 a; KENNEDY, 1998 b; CLEMENTE et al., 2005). O BBI clássico pode suprimir a carcinogênese em uma variedade de modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*. Em 1992, esse composto foi considerado um agente anticarcinogênico pelo órgão internacional *Food and Drug Administration*. Recentemente, ensaios clínicos com o BBI na forma de BBIC (concentrado de extrato de soja enriquecido com BBI) vêm sendo realizados (KENNEDY, 1998 a). Dentre eles, destacam-se a avaliação da atividade preventiva e anticarcinogênica do BBIC em pacientes com leucoplasia oral (lesão pré-maligna de câncer de boca) e câncer de próstata. As duas primeiras fases do ensaio clínico realizado em leucoplasia oral mostraram que o BBIC resultou na redução dose-dependente da lesão, chegando a uma redução total, sem constatação de toxicidade ou efeitos colaterais severos (ARMSTRONG et al., 2000 a; ARMSTRONG et al., 2000 b; MEYSKENS, 2001).

Ainda há muito a ser explorado no estudo de IPBBIs como agentes anticarcinogênicos. Considerando-se apenas publicações científicas de conteúdo original, somente cerca de 55 artigos foram publicados sobre esse assunto no período entre 1981 e 2007. Entre esses artigos, aproximadamente 65% descrevem os IPBBIs como agentes preventivos, ou seja, agentes com efeitos de impedir ou minimizar a incidência de câncer induzido por radiação ou reagente químico. Artigos sobre IPBBIs como agentes terapêuticos, ou seja, agentes com efeitos citostáticos e/ou citotóxicos em células tumorais estabelecidas, compreendem 35% dos trabalhos publicados (Figura 9).

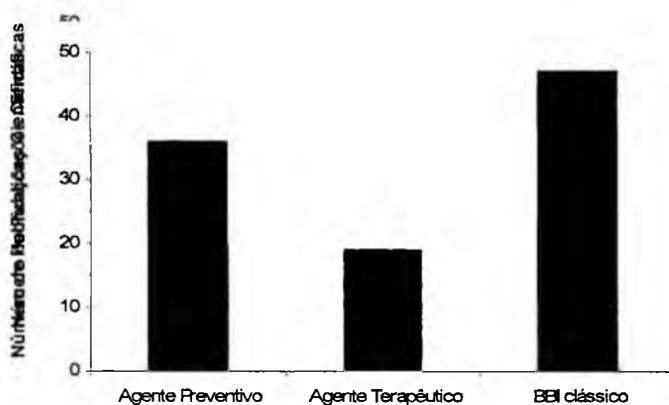


Figura 9. Publicações científicas de conteúdo original relacionando inibidores de protease da família Bowman-Birk e câncer publicados entre os anos de 1981 e 2007. Pesquisa realizada no site de pesquisa de publicações científicas PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) com as palavras: *Bowman and Birk and cancer*. Revisões, comentários e artigos não relacionados foram excluídos da contagem.

Adicionalmente, a maioria das publicações (aproximadamente 47) referem-se ao BBI clássico. Portanto, considerando-se o potencial de aplicabilidade desses inibidores no câncer, mais trabalhos visando a identificação e avaliação de outros representantes

de IPBBIs que possam atuar como agentes anticarcinogênicos terapêuticos precisam ser realizados.

Nesse contexto, o BTCI é um potencial candidato a ser avaliado como agente anticarcinogênico terapêutico. Apesar desse composto ser um IPBBI amplamente caracterizado sobre seus aspectos estruturais e funcionais, até o presente momento, nenhum estudo foi realizado sobre sua atuação no câncer. O BTCI apresenta estrutura e atividade inibitória semelhante ao BBI clássico (Figura 7). Essa semelhança permite hipotetizar que ele também possa apresentar atividade anticarcinogênica.

1.4 PEPTÍDEOS DERIVADOS DE MOLÉCULAS NATURAIS

Muitas drogas anti-tumorais e anti-infecciosas comercializadas utilizam compostos naturais diretamente extraídos e purificados a partir de plantas selvagens ou cultivadas. Devido a sucessivas extrações e aos processos de purificação para isolar compostos de interesse, muitas espécies vegetais têm sido ameaçadas de extinção (RATES, 2001). Além desse risco, o tempo requerido, a dificuldade de extração e a obtenção de elevadas quantidades de compostos naturais são considerados no preço do medicamento, tornando-o caro e pouco acessível para a maioria da população (HAMBURGER et al., 1991).

O desenho e a síntese química de novas drogas, tendo como molde moléculas naturais, é uma área de pesquisa crescente. Além de manter a preservação da biodiversidade, avanços desenvolvidos nessa área trazem importantes vantagens como: obtenção de grandes quantidades de amostra em curto espaço de tempo, melhor

controle dos graus de pureza, produção e qualidade do produto e redução dos custos de produção (HAMBURGER et al., 1991; LATHAM, 1999; MANN, 2002; RATES, 2001).

Considerando seu amplo potencial de aplicação na medicina (JOANITTI et al., 2006; FEAR, 2007; PANDEY et al., 2007), especialmente como agentes anticarcinogênicos, os inibidores de proteases isolados de plantas têm sido utilizados como moldes para o desenho e síntese de peptídeos biologicamente ativos. Um dos objetivos dessa pesquisa é a redução de tamanho e a simplificação da estrutura dos inibidores de protease para elementos estruturais mínimos (GUTTE, 1995; KASHER et al., 1999; MCBRIDE et al., 2002). O emprego de peptídeos derivados de inibidores de protease facilita o estudo para a otimização de especificidade e afinidade na inibição de determinadas proteases (VITA et al., 1997; CLEMENTE, 2006). A partir dos resíduos de aminoácidos presentes em um peptídeo ativo, é possível criar uma biblioteca de combinações e baseando-se nela, encontrar peptídeos potencialmente melhores que os originais. Adicionalmente, a identificação e desenvolvimento de novas estruturas apresentando propriedades terapêuticas que não haviam sido atribuídas para os compostos originais também podem ser encontradas (HAMBURGER et al., 1991; MCBRIDE et al., 2001).

Diversos trabalhos foram publicados descrevendo a síntese de peptídeos derivados de IPBBIs que preservaram atividade inibitória e estrutura conformacional muito semelhante à molécula de origem (NISHINO et al., 1975; ANDO et al., 1987; DOMINGO et al., 1995; MCBRIDE et al., 2001; BRAUER et al., 2002; CLEMENTE, 2006; FERNANDEZ et al., 2007). Curiosamente, peptídeos semelhantes aos sintetizados também foram encontrados na natureza. Um trabalho recente isolou um

peptídeo presente em girassol (SFTI-1) com sítio reativo correspondente ao do BBI clássico (LUCKETT et al., 1999).

A continuação dos estudos de peptídeos derivados de inibidores de protease permitirão aperfeiçoar o processo de desenvolvimento e síntese de novas drogas (JOANITTI et al., 2006), incluindo aquelas com características anticarcinogênicas (LEUNG et al., 2000). Apesar dos avanços nos estudos dessa área, resultados de peptídeos derivados de IPBBIs com efeitos anticarcinogênicos ainda não foram publicados.

2. Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, os tratamentos empregados para o câncer de mama têm eficiência moderada e causam efeitos colaterais severos que diminuem a qualidade de vida do paciente (BURNET et al., 2000; NIH, 2005). Nesse contexto, existe uma busca constante por novos tratamentos e moléculas anticarcinogênicas eficientes e não indutoras de efeitos colaterais severos. Dentre diversos compostos anticarcinogênicos purificados a partir de plantas, os IPBBIs têm se destacado (JOANITTI et al., 2006).

Os IPBBIs são moléculas potencialmente importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos preventivos e terapêuticos contra o câncer. Eles podem suprimir a carcinogênese em uma variedade de modelos de estudo *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos com ausência de toxicidade ou efeitos colaterais severos (FERNANDES et al., 1995; KENNEDY, 1998 a; KENNEDY, 1998 b; ARMSTRONG et al., 2000 a; CLEMENTE et al., 2005).

Apesar desses resultados promissores ainda há muito a ser explorado no estudo de IPBBIs como agentes anticarcinogênicos. Entre apenas 55 artigos originais publicados sobre esse assunto, no período entre 1981 e 2007, a minoria relatou efeitos anticarcinogênicos terapêuticos para os IPBBIs (Figura 9). Além disso, a maioria dos trabalhos referiu-se apenas ao BBI clássico. Sendo assim, a avaliação de outros membros de IPBBIs que possam atuar como agentes anticarcinogênicos terapêuticos precisam ser realizados. O BTCI é um potencial candidato para essa avaliação. Além, de não haver nenhum estudo sobre a atuação do BTCI no câncer, a semelhança estrutural e funcional entre BTCI e BBI clássico permite hipotetizar que ele também possa apresentar atividade anticarcinogênica (Figura 7).

Com estudos sobre a estrutura e atividades de IPBBIs naturais, novas drogas contra o câncer podem ser projetadas. Os resultados dessas pesquisas são promissores para a síntese de novos peptídeos que, além de manter ou intensificar os efeitos anticarcinogênicos já descritos para os IPBBIs, possam ser produzidos em grandes quantidades com custos de produção reduzidos e em curto espaço de tempo (HAMBURGER et al., 1991; MCBRIDE et al., 2001). Apesar dos avanços nos estudos dessa área, resultados de peptídeos derivados de IPBBIs com efeitos anticarcinogênicos ainda não foram relatados na literatura.

Diante da justificativa exposta acima, o presente trabalho visa analisar os efeitos anticarcinogênicos terapêuticos do BTCI e de peptídeos derivados utilizando como modelo de estudo células de câncer de mama, considerada uma das neoplasias malignas mais freqüentes e agressivas no Brasil e no mundo.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos citostáticos e citotóxicos do inibidor de proteases da família Bowman-Birk – BTCI – e de peptídeos derivados em células de câncer de mama da linhagem MCF-7.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade de inibição de proteases de dois peptídeos derivados do BTCI: PTRY e PCHY.
- Analisar os efeitos citostáticos e citotóxicos de BTCI, PTRY e PCHY em células de câncer de mama.
- Determinar a citotoxicidade de BTCI, PTRY e PCHY em células de fibroblastos normais e hemácias.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos, materiais e reagentes utilizados

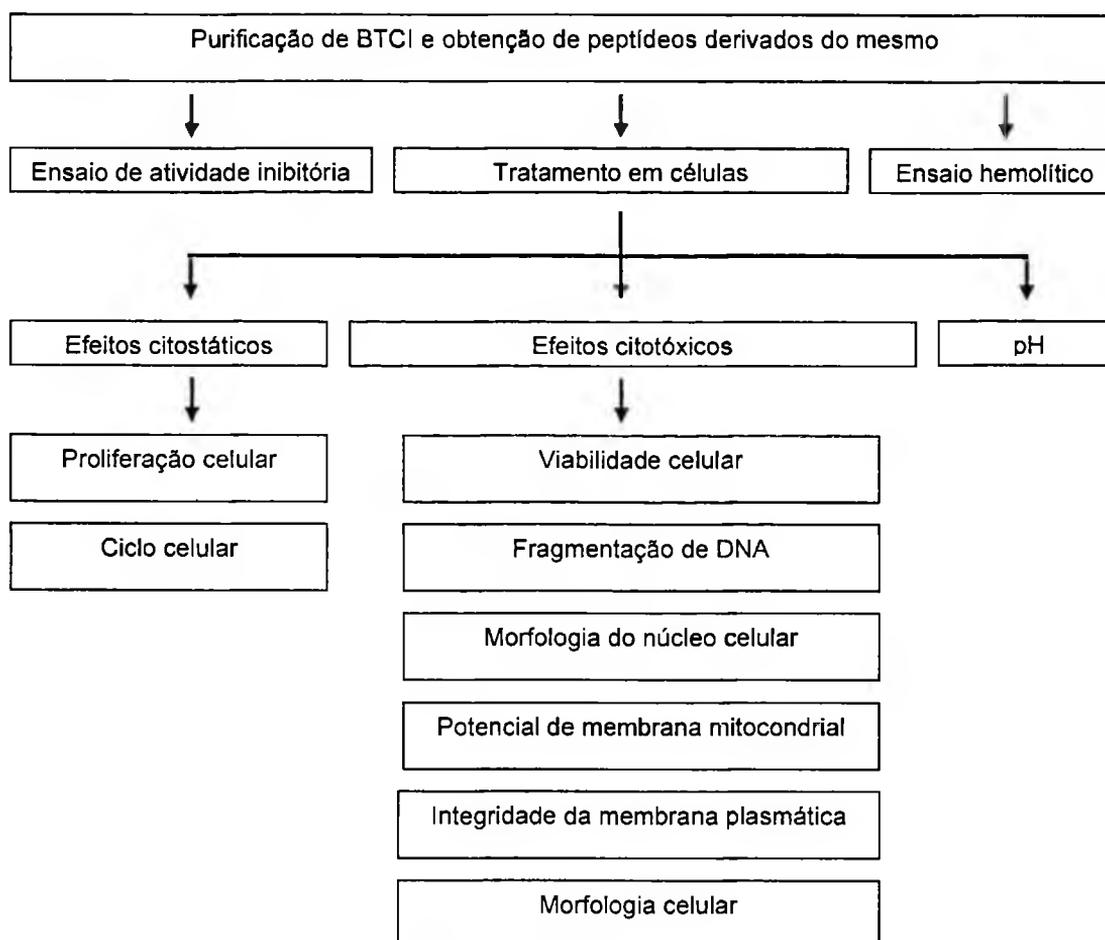
Equipamentos	Fabricante
Balança Analítica Modelo AA-200	Denver Instrument Company, EUA
Câmara de Neubauer	C. A. Hausser & Son, EUA
Câmara digital	Zeiss, ALE
Centrífuga Himac CR 21	Hitachi Koki Co., JAP
Centrífuga Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, ALE
Citômetro de fluxo (FACSCallibur)	Becton & Dickenson, EUA
Coluna cromatográfica (3,5 × 23 cm)	BioRad, EUA
Espetrofotômetro Modelo V-530	JASCO, JAP
Estufa	Tecnal, BRA
Fluxo Laminar	Veco, BRA
Homogeneizador	Quimis Aparelhos Científicos, BRA
Leitora de Microplaca Modelo 3550-V	BioRad, EUA
Liquidificador	Metalurgia SIEMSEN, BRA
MALDI-TOF/MS UltraFlex II	Bruker Daltonics, ALE
Microscópio de fluorescência Axioskop	Zeiss, ALE
Microscópio de luz invertido	Unico, EUA
Microscópio eletrônico de transmissão	Jeol JEM, modelo 1011, JAP
pHgâmetro Accumet Basic AB 15	Fisher Scientific, EUA
Ultramicrotomo	Reichert modelo Supernova, EUA

Materiais	Fabricante
Criotubos	TPP, ALE
Frascos de Cultura	TPP, ALE
Lâmina	Perfecta, BRA
Lamínula	Perfecta, BRA
Membranas com poros de 0,22 µm	TPP, ALE
Membranas de diálise	BioRad, EUA
Papel filtro	J Prolab, BRA
Papel indicador de pH	Whatman, ALE
placas de 96 poços	TPP, ALE
Placas de cultura de células	TPP, ALE
Tubos Falcon de 15 e 50 mL	TPP, ALE

Reagentes	Fabricante
Acetato de uranila	Electron Microscopy Sciences, EUA
Acetona	Electron Microscopy Sciences, EUA
Acetonitrila	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ácido acético	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Ácido Clorídrico	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Ácido tricloroacético (TCA)	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Ácido trifluoroacético	Sigma-Aldrich Co., EUA
ácido α -cyano-4-hidroxi- cinamico	Bruker Daltonics, ALE
Albumina Sérica Bovina (BSA)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Azul Tripán	Sigma-Aldrich Co., EUA
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Cacodiato de sódio	Electron Microscopy Sciences, EUA
Citrato de Sódio	Invitrogen, EUA
Cloreto de Cálcio	J. T. BAKER, EUA
Cloreto de Sódio	J. T. BAKER, EUA
DEAE-celulose	Sigma-Aldrich Co., USA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich Co., EUA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Gibco, USA
Ferricianeto	Electron Microscopy Sciences, EUA
Fosfato de Potássio Monobásico	Sigma-Aldrich Co., USA
Glutaraldeído	Electron Microscopy Sciences, EUA
Hidróxido de Sódio	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Iodeto de Propídio	Invitrogen, EUA
MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	Invitrogen, EUA
N - glutaryl - L - phenylalanine - p - nitroanilide : GPNA	Sigma-Aldrich Co., EUA
N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride –BAPNA	Sigma-Aldrich Co., EUA
Paraformaldeído	Vetec Química Fina Ltda, BRA
PMSF	Roche Applied Science, EUA
Quimotripsina (alpha)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Resina Spurr	Electron Microscopy Sciences, EUA
Rodamina 123	Invitrogen, EUA
Sacarose	J. T. BAKER, EUA
Soro Fetal Bovino	Gibco, USA
Sulfato de amônio	Sigma-Aldrich Co., USA
Tampão fosfato-salina (PBS)	Laborclin, BRA
Tetróxido de ósmio	Electron Microscopy Sciences, EUA
Tripsina	Sigma-Aldrich Co., EUA

Reagentes (continuação)	Fabricante
Tripsina-EDTA (0,25 e 0,02 %)	Gibco, USA
Tris	Merck, ALE
Triton X-100	Merck, ALE

4.2 Desenho Experimental (resumo esquematizado da metodologia)



4.3 Purificação de BTCl

4.3.1 Obtenção de sementes de *Vigna unguiculata*

Sementes matrizes de feijão-de-corda da espécie *Vigna unguiculata* (variedade Seridó), foram obtidas do banco de sementes mantido pelo Departamento de Bioquímica da Universidade de Fortaleza. Parte das sementes foi estocada a 4°C e a outra parte foi plantada na Estação de Biologia Experimental da Universidade de Brasília. Em aproximadamente três meses após o plantio, as sementes já estavam completamente desenvolvidas e prontas para serem usadas na purificação de BTCl (Figura 10).

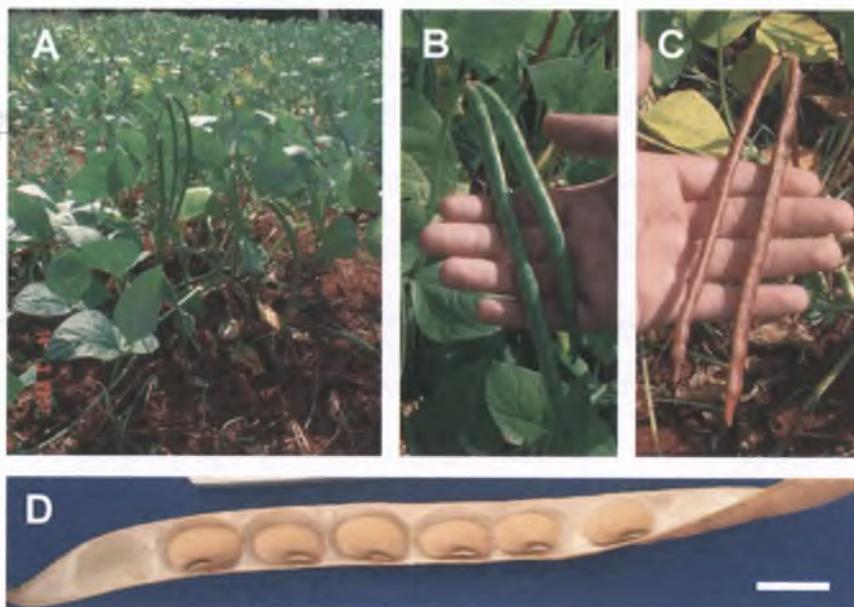


Figura 10. *Vigna unguiculata*. A) Plantação na Estação Biológica da Universidade de Brasília. B) Vagem jovem. C) Vagem madura. D) Sementes maduras. Barra = 1 cm.

4.3.2 Preparação de Extrato Bruto

A obtenção do extrato bruto das sementes de *V. unguiculata* foi realizada segundo metodologia descrita por VENTURA e colaboradores (1966).

As sementes coletadas foram secas a temperatura ambiente e submetidas a trituração até a formação de um pó. Quinhentos gramas desse pó foram misturados em 2 litros de água destilada e 200 µL de PMSF 200 mM. Essa mistura foi mantida a 4°C sob agitação constante por 12 horas. Em seguida, a mistura foi novamente homogeneizada em um liquidificador por 15 minutos, filtrada em tecido de algodão e centrifugada a 12000 g por 30 minutos a 4°C. O material retido no tecido de algodão foi novamente homogeneizado em liquidificador por 15 minutos com mais 500 mL de água destilada e, em seguida, filtrado e centrifugado na mesma condição descrita anteriormente.

Os sobrenadantes foram reunidos e submetidos a uma precipitação com ácido tricloroacético (TCA) na concentração final de 2,5%. O TCA foi adicionado gradativamente (2 gotas/segundo) ao sobrenadante, o qual foi mantido sob agitação constante por 1 hora a 4°C. Em seguida, essa mistura foi filtrada em papel filtro e submetida a precipitação com sulfato de amônio, na forma sólida, até a saturação de 50%. Após 1 hora de agitação, o material resultante foi centrifugado a 12000 g por 40 minutos a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* totalmente dissolvido em aproximadamente 25 mL de água destilada e dialisado contra água destilada por 12 horas. Após a diálise, o extrato bruto final foi liofilizado e armazenado a - 30°C até o momento do uso.

4.3.3 Cromatografia de troca iônica

A purificação de BTCl a partir do extrato bruto foi realizada segundo a metodologia descrita por Ventura *et al* (1966). A purificação foi realizada em coluna cromatográfica (3,5 × 23 cm) preenchida com DEAE-celulose e ativada pelo seguinte processo: adição de 250 mL de HCl 200 mM; 300 mL de água destilada; seguida de 250 mL de NaOH 200 mM; 300 mL de água; seguida de 30 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,3) e 300 mL de tampão de equilíbrio (fosfato de potássio 10 mM, pH 7,3). Trezentos miligramas de extrato bruto foram diluídos em 10 mL de tampão de equilíbrio e centrifugados por 10 minutos a 14500 g. Após a aplicação do sobrenadante, a coluna foi lavada com 300 mL do tampão de equilíbrio.

A eluição de BTCl foi realizada aplicando um gradiente linear de 500 mL de NaCl variando de 0 a 800 mM (fluxo de 3 mL/minuto). Após desprezar os primeiros 150 mL, o material eluído foi coletado em frações de 3 mL e monitorado quanto a presença de proteínas, pela leitura de absorbância em 280 nm.

As frações correspondentes ao pico de eluição de BTCl foram dialisadas contra água destilada por 12 horas, congeladas em banho de álcool a – 80°C e liofilizadas.

4.3.4 Análise da pureza da amostra

A pureza das frações contendo BTCl foi determinada por espectrometria de massa. Amostras de BTCl liofilizado foram dissolvidas em água nanopura e diluídas (na proporção de 1:3, v/v) em uma solução de matriz saturada de ácido α -cyano-4-hidroxi-cinamico (5 mg de ácido α -cyano-4-hidroxi-cinamico, 200 μ L de água nanopura, 250 μ L

de acetonitrila e 50 µL de ácido trifluoroacético). Em seguida, 0,5 µL da mistura de amostra e matriz foram depositados em uma placa de MTP AnchorChip 600/384. Os espectros foram obtidos com aplicação de laser de frequência de 50 Hz em modo linear positivo, após a calibração do equipamento. Posteriormente, os dados foram analisados pelo programa FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, ALE).

4.4 Obtenção dos Peptídeos derivados de BTCI

Dois peptídeos, denominados de PTRY e PCHY, foram desenhados a partir da molécula do BTCI. Eles foram sintetizados, purificados e liofilizados pela empresa GenScript (EUA) e ficaram armazenados a -30°C até o momento do uso.

4.5 Atividade inibitória de BTCI e de peptídeos derivados

Para determinar se o BTCI purificado e seus peptídeos derivados mantinham atividade de inibição específica para tripsina e quimotripsina, as moléculas foram submetidas a ensaios de inibição de atividade proteolítica.

4.5.1 Ensaio de inibição de tripsina

A tripsina foi dissolvida em solução HCl 1 mM para a concentração final de 64 µg/mL. Seu respectivo substrato sintético (N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride – BAPNA) foi dissolvido em 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 500 µL de tampão de ensaio para tripsina (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8,2) para a

concentração final de 430 µg/mL. Quarenta µL de BTCl, PTRY ou PCHY, dissolvidos em tampão de ensaio para tripsina, foram incubados com 40 µL de tripsina por 15 minutos a temperatura ambiente, em placas de 96 poços. Em seguida, 200 µL de substrato foram adicionados a solução anterior e a mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Trinta µL de ácido acético 30% foram utilizados para parar a reação. A absorbância de cada amostra foi determinada no comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro conjugado a uma leitora de placas. O controle positivo da reação foi feito da mesma maneira descrita anteriormente na ausência de BTCl, PCHY ou PTRY. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.5.2 Ensaio de inibição de quimotripsina

A quimotripsina foi dissolvida em solução HCl 1 mM para a concentração final de 630 µg/mL. Seu respectivo substrato sintético (N - glutaryl - L - phenylalanine - p - nitroanilide GPNA) foi dissolvido em 500 µL de DMSO e 500 µL de tampão de ensaio para quimotripsina (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,6) até a concentração final de 400 µg/mL. Quarenta µL de BTCl, PTRY ou PCHY dissolvidos em tampão de ensaio para quimotripsina foram incubados com 40 µL de quimotripsina por 15 minutos a temperatura ambiente em placa de 96 poços. Em seguida, 200 µL de substrato foram adicionados a solução anterior e a mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Trinta µL de ácido acético 30% foram utilizados para interromper a reação. A absorbância de cada amostra foi determinada no comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro conjugado a uma leitora de placas. O controle positivo da reação foi

feito da mesma maneira descrita anteriormente na ausência de BTCl, PTRY ou PCHY. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.6 Cultura de células

4.6.1 Linhagens Celulares

A linhagem celular derivada de câncer de mama utilizada no estudo foi a MCF-7. Ela foi obtida do banco de células American Type Culture Collection (ATCC). Em 1970, células de câncer de mama já em metástase foram isoladas de uma paciente e estabelecidas como uma linhagem celular permanente (SOULE et al., 1973; LEVENSON et al., 1997). Diversos estudos posteriores foram realizados para caracterizar essas células. Essa linhagem apresenta como principais características: crescer de forma aderente ao substrato, ser responsiva à presença de estrógeno e não possuir caspase 3 (LEVENSON et al., 1997; BUROW et al., 1998). Devido ao conhecimento bem estabelecido de suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares, a linhagem MCF-7 têm sido um dos modelos celulares mais utilizados na pesquisa de câncer, tanto no estudo de efeitos de compostos anticarcinogênicos quanto na elucidação dos mecanismos de ação dos mesmos.

A linhagem de fibroblastos normais humanos (FHN) utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Rui Curi do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). É uma linhagem imortalizada que cresce de forma aderente ao substrato e apresenta morfologia fusiforme.

4.6.2 Manutenção da cultura de células

Todos os procedimentos foram realizados com materiais rigorosamente esterelizados e em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultra-violeta permaneceu ligada por 30 a 40 minutos antes do uso.

Alíquotas de células de câncer de mama e fibroblastos foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente a 37°C. Quinhentos µL das alíquotas foram lentamente adicionados em 3 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico). Esse meio de cultura foi utilizado em todos os outros procedimentos experimentais. Em seguida, as células foram centrifugadas a 750 g por 5 minutos, ressuspensas em 5 mL de meio de cultura DMEM, transferidas para um frasco de cultura de células e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Para assegurar a qualidade das células a serem utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas o meio de cultura era substituído por um meio de cultura novo. A cultura de células era observada em microscópio de luz invertido e monitorada quanto ao crescimento celular, aspectos morfológicos e presença de contaminantes.

Ao atingir o estágio de confluência (elevada densidade de células em uma determinada área) as células foram removidas do frasco de cultura e recultivadas em uma densidade menor seguindo o procedimento descrito a seguir. O meio de cultura foi descartado e 2 mL de solução de tripsina-EDTA foram adicionados ao frasco de cultura para a remoção da monocamada de células. Após 2 minutos de incubação em estufa a 37°C, a remoção das células foi observada em microscópio de luz invertido. Em

seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada a 750 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente, 10% das células foram recultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O restante foi utilizado em experimentos ou recebeu a adição de hipoclorito de sódio e detergente e, após 24 horas foram descartados.

Após o término dos experimentos, as células de câncer de mama e fibroblastos foram congeladas de acordo com o procedimento descrito a seguir. No estágio de confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura e centrifugadas (como descrito acima). Após o descarte do meio de cultura, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (DMEM, 20% soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 5% de DMSO). A suspensão celular foi rapidamente transferida para criotubos, os quais foram identificados e envolvidos por uma espessa camada de papel toalha e mantidos a - 80°C por 24 horas. Em seguida, os criotubos foram estocados imersos em nitrogênio líquido.

4.7 Preparação das amostras de BTCl, PTRY e PCHY para o tratamento das células

BTCl purificado (item 4.3) foi diluído em água nanopura (Milli-Q) e esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm. Para a determinação da concentração de BTCl em solução foi feita uma leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 280 nm

de uma alíquota da solução filtrada. A absorbância obtida foi empregada na seguinte fórmula:

$$\text{Concentração (mg/mL)} = \frac{(A_{280} \times 10)}{A^{1\%}_{280}}$$

A_{280} = Absorbância da amostra no comprimento de onda de 280 nm.

$A^{1\%}_{280}$ = Absorbância da solução de 1% de BTCl no comprimento de onda de 280 nm, que é igual ao valor de 8,23.

A partir de estoques liofilizados, os peptídeos derivados de BTCl foram pesados em tubos previamente esterelizados. Em seguida, em um fluxo laminar, os peptídeos foram diluídos em água nanopura estéril em quantidade suficiente para obter a concentração desejada.

Uma solução estoque de albumina sérica bovina (BSA) foi preparada, esterilizada e quantificada como descrito acima para o BTCl, considerando que o $A^{1\%}_{280}$ do BSA é igual a 6,67 (FASMAN, 1989).

Após a determinação da concentração, as suspensões de BTCl, PTRY, PCHY ou BSA (denominadas de solução estoque) foram imediatamente testadas na cultura de células ou estocadas a -30°C até o momento do uso.

4.8 Tratamento das células com BTCl e peptídeos derivados

Ao atingir o estágio de confluência, as células de câncer de mama ou fibroblastos foram removidos do frasco de cultura e centrifugados como descrito no item

4.6. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Para a determinação do número de células, 10 µL da suspensão de células foi adicionado a 40 µL de solução de azul tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Oito µL dessa mistura foram depositados gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contados em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Número de células/ mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Numero de quadrantes contados (=4)}} \times \text{fator de diluição (=5)} \times 10^4$$

As células contadas foram transferidas para placas de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 12 a 16 horas para a completa adesão das células no fundo da placa. As células foram transferidas para placas de tamanhos diferentes dependendo do experimento a ser realizado. Placas de 96 poços foram utilizadas para ensaios de viabilidade celular por MTT (ver item 4.10.1) com concentração inicial de 5 x 10³ células/poço. Placas de 12 poços foram utilizadas no restante dos experimentos com concentração inicial de 5 x 10⁴ células/poço.

Após o período de incubação na estufa, as placas de cultura foram observadas em microscópio de luz invertido para a avaliação da morfologia, dispersão das células pela placa e presença de contaminação. Essa análise foi realizada para decidir se as células estavam homoganeamente dispersas e saudáveis para serem submetidas aos ensaios com o BTCl e seus peptídeos.

O meio de cultura contendo BTCl, PTRY, PCHY ou BSA foi preparado a partir da diluição de soluções estoque dessas moléculas (ver item 4.7) em meio de cultura. As doses utilizadas nos experimentos variaram de 100 a 400 µM. O meio de cultura do

grupo controle (ausência de BTCl ou peptídeos) continha apenas água nanopura na mesma proporção que foi adicionada aos outros grupos experimentais. Essas doses foram determinadas com base em trabalhos publicados com o BBI clássico (CHEN et al., 2005; CLEMENTE et al., 2005). BSA é uma proteína não tóxica e abundante no plasma sanguíneo humano. Nesse, estudo a solução de BSA foi utilizada como um controle negativo com o objetivo de avaliar se a adição de determinadas quantidades de proteínas poderia causar alguma alteração na osmolaridade do meio de cultura e, assim, alterar a proliferação ou viabilidade das células.

O meio de cultura das placas foi substituído pelo que continha BTCl, PTRY, PCHY ou BSA. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas. Após o período de incubação as células foram preparadas de maneira adequada para a realização dos testes.

As células tratadas em placas de 96 poços foram processadas como descrito no item 4.10.1. As células tratadas nas placas de 12 poços, utilizada na maioria dos testes, foram submetidas ao processamento descrito a seguir. O meio de cultura das células tratadas foi removido e reservado. Em seguida, as células foram removidas da placa com a adição de 500 µL de solução de tripsina-EDTA e incubação a 37°C por 2 minutos. O meio de cultura anteriormente reservado foi utilizado para bloquear a ação da tripsina. A suspensão (meio de cultura, tripsina e células) foi centrifugada a 750 g por 5 minutos, teve o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 100 µL de meio de cultura. A partir dessa suspensão de células foram realizados os testes descritos abaixo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e por três vezes independentemente.

4.9 Análise de efeitos citostáticos

Esses testes têm como objetivo avaliar se o BTCl ou PCHY induzem efeitos relacionados ao bloqueio da proliferação e do ciclo celular. Tal avaliação é importante, considerando que a proliferação celular descontrolada é uma das principais características do câncer. Além disso, moléculas indutoras de efeitos citostáticos em células tumorais são promissoras para tratamentos terapêuticos dessa doença.

4.9.1 Proliferação Celular

Após remover as células tratadas com BTCl ou PCHY das placas de cultura (ver item 4.8) elas foram homogeneizadas em 100 μ L de meio de cultura. Dez μ L dessa suspensão foram adicionados a 20 μ L de solução de azul tripan. Oito μ L dessa mistura foram lentamente depositados em câmara de Neubauer e o número total de células (vivas e mortas) contidas na suspensão foi determinado como descrito no item 4.8.

4.9.2 Ciclo Celular

A identificação das fases do ciclo celular foi realizada de acordo com protocolo descrito (PERES et al., 2005). Após o tratamento, células ressuspensas em 100 μ L de meio de cultura (ver item 4.8) foram incubadas em 200 μ L de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 μ g/mL de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram protegidas da luz

durante o tempo de incubação. Em seguida, essa suspensão foi avaliada em citômetro de fluxo no canal FL2-A (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm) para a identificação das fases do ciclo celular. Os dados obtidos foram analisados com o programa CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickinson, EUA). O cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular foi realizado considerando-se apenas as células com DNA não fragmentado.”

4.10 Análise de efeitos citotóxicos

Esses testes têm como objetivo avaliar se o BTCl, PTRY ou PCHY induzem efeitos em estruturas celulares vitais levando a morte celular. Tal avaliação foi feita em diversas estruturas celulares visando observar diferentes aspectos dos efeitos dessas moléculas nas células. Essas observações fornecem pistas valiosas sobre os possíveis mecanismos de ação do BTCl, PTRY ou PCHY. Considerando, que a indução de morte celular é uma das principais estratégias utilizadas em tratamentos contra o câncer, a identificação de novas moléculas com tais efeitos são potencialmente promissoras.

4.10.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT estabelecido por MOSMANN (1983). Esse é um dos métodos colorimétricos mais utilizados em *screenings* para identificar e determinar as concentrações ativas de novas moléculas anticarcinogênicas. Em células viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenase, reduzem o substrato MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide) formando formazan, um produto de cor azulada. Dessa forma, a quantificação da produção de formazan por células submetidas a determinado tratamento está correlacionada com sua viabilidade.

As células tumorais foram cultivadas e tratadas com BTCI, PTRY e PCHY em placas de 96 poços como descrito no item 4.8. Após o período de incubação, o meio de cultura das placas foi removido e 150 μ L de solução de uso de MTT (15 μ L de MTT 5mg/mL diluídos em 135 μ L de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 100 μ L de DMSO foi adicionado em cada poço para dissolver o formazan formado. A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorbância dos poços no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas.

4.10.2 Fragmentação de DNA

A determinação da fragmentação de DNA foi realizada de acordo com protocolo já descrito (PERES et al., 2005). Após o tratamento, células ressuspensas em 100 μ L de meio de cultura (ver item 4.8) foram incubadas em 200 μ L de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 μ g/mL de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram protegidas da luz durante o tempo de incubação. Em seguida, essa suspensão foi avaliada em citômetro de fluxo no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm). Os

dados obtidos foram analisados no programa CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickinson, EUA).

4.10.3 Morfologia do Núcleo

A coloração do núcleo celular com intercalantes de DNA fluorescentes é uma metodologia de rápida realização que tem sido utilizada para analisar a morfologia nuclear e correlacioná-la com resultados de outros experimentos como a fragmentação de DNA (DARZYNKIEWICZ et al., 1997). No presente estudo, utilizamos o corante alaranjado de acridina. Esse corante atravessa a membrana plasmática e intercala no DNA corando-o de verde (SODERSTROM et al., 1977).

Após o tratamento (ver item 4.8), 20 μL da suspensão de células de cada grupo foram adicionados a 1 μL de solução de alaranjado de acridina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A mistura foi depositada no centro de uma lâmina de vidro, previamente limpa e identificada com o grupo experimental a qual aquelas células pertencem. Uma lamínula de vidro foi delicadamente depositada sobre o líquido espalhando-o pela lâmina. Em seguida, as lâminas foram imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência com filtro de 530 nm. A aquisição das imagens foi realizada com o uso de câmera digital e um software de aquisição de imagem (Zeiss, ALE).

4.10.4 Potencial de Membrana Mitocondrial

A rodamina 123 é uma molécula fluorescente catiônica permeável à membrana plasmática e rapidamente sequestrada por mitocôndrias com potencial de membrana

normalizado. Alterações no potencial de membrana da mitocôndria desencadeiam um efluxo da rodamina 123 da mitocôndria (CHEN et al., 1982). Muitos grupos de pesquisa vêm utilizando esse composto para analisar alterações no potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com compostos citotóxicos (PERES et al., 2005).

No presente estudo, a determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada de acordo com protocolo já descrito (PERES et al., 2005). Após o tratamento, células ressuspensas em 100 μ L de meio de cultura (ver item 4.8) foram lavadas com 500 μ L de PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS e incubadas no escuro com 0,5 μ L de solução de rodamina 123 (5mg/mL diluídos em etanol) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS. Por fim, elas foram incubadas com 300 μ L de PBS por 30 minutos (temperatura ambiente e no escuro) e avaliadas em citômetro de fluxo no canal FL1-H (sensível a detecções na faixa de 515 a 530 nm). Os dados obtidos foram analisados no programa CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickinson, EUA). Todas as etapas de lavagem foram seguidas por centrifugação (750 g por 3 minutos) e descarte do sobrenadante.

4.10.5 Integridade da Membrana Plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada pelo método de exclusão por azul de tripan. Em células viáveis, esse corante penetra pela membrana plasmática, mas é rapidamente externalizado. Já em células que apresentam a membrana

plasmática comprometida, o azul de tripan não é externalizado e a célula permanece corada de azul (FRESHNEY, 2000).

Após o tratamento, as células foram ressuspensas em 100 μL de meio de cultura (ver item 4.8). Dez μL dessa suspensão foram adicionados a 20 μL de solução de azul tripan. Oito μL dessa mistura foram lentamente depositados em câmara de Neubauer e o número de células foi determinado como descrito no item 4.8. As células foram contadas diferencialmente, sendo que células brancas foram consideradas com a membrana plasmática íntegra e, células coradas de azul com a membrana plasmática danificada. Em seguida, a proporção de células coradas em azul em relação ao número total de células foi determinada.

4.10.6 Morfologia Celular

A morfologia celular é um importante indicativo de viabilidade. Alterações severas desencadeadas por agentes citotóxicos geralmente culminam na modificação da morfologia celular. Tais modificações podem ser caracterizadas por microscopia de contraste de fase, microscopia eletrônica de transmissão e também por citometria de fluxo.

4.10.6.1 Microscopia de contraste de fase

A microscopia de contraste de fase consiste na passagem da luz do microscópio por um anel de contraste, que atinge a amostra e produz um efeito de destaque, onde

estruturas claras ficam mais claras e estruturas escuras ficam mais escuras. Dessa forma é possível observar e analisar rapidamente a morfologia de células imersas em meio de cultura sem utilização de fixadores ou corantes.

No presente trabalho, após o período de tratamento (ver item 4.8), as placas de cultura foram observadas em microscópio de contraste de fase invertido. A aquisição das imagens foi realizada com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e o software de aquisição Scope (versão 1.0.0.0, 2003).

4.10.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise das células por microscopia eletrônica de transmissão permitiu determinar as alterações ultra-estruturais induzidas pela adição de BTCl ou PCHY. Células tratadas conforme descrito no item 4.8 foram previamente lavadas em PBS e fixadas por 2 horas em fixador Karnowsky (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, sacarose 3%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) a temperatura ambiente. Após o período de fixação, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M pH 7,2) e submetidas a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% (em tampão cacodilato de sódio) e ferricianeto de potássio 0,8% (em tampão cacodilato de sódio), na proporção de 1:1 (v/v), por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas em água destilada e contrastadas *in bloco* com acetato de uranila aquoso 0,5% por 90 minutos. Em cada processo de lavagem foi realizada uma centrifugação a 750 g por 5 minutos, seguida do descarte do sobrenadante.

As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona: 50, 70, 90 e 100% (a última foi repetida 2 vezes) por 15 minutos em cada concentração. As

amostras foram infiltradas na mistura resina : acetona em concentrações crescentes de resina Spurr e decrescentes de acetona, em movimento giratório. Cada ifiltração teve duração de, aproximadamente, 12 horas. Em seguida, as amostras foram infiltradas apenas em resina Spurr e, após 6 horas, foram polimerizadas em estufa a 60°C por 72 horas. Os blocos polimerizados foram desbastados e seccionados em cortes ultrafinos em um ultramicrotomo e, posteriormente, examinados em microscópio eletrônico de transmissão.

4.10.6.3 Determinação de tamanho e granulosidade celular

A citometria de fluxo vem sendo empregada na análise de alguns parâmetros morfológicos como tamanho e granulosidade celular (DARZYNKIEWICZ et al., 1997). Nessa técnica um feixe de luz incide sobre as células e suas características de tamanho e granulosidade são identificadas pelos detectores FSC (*forward angle light scatter*) e SSC (*side angle light scatter*), respectivamente. Dessa forma, é possível obter características morfológicas de um grande número de células em um curto período de tempo.

No presente trabalho, após os tratamentos (ver item 4.8), a suspensão de células foi diluída em 200 µL de PBS e avaliada em citômetro de fluxo utilizando-se os detectores FSC e SSC. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico e posteriormente analisados no software CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickinson, EUA).

4.11 Ensaio Hemolítico

Foi realizado um teste hemolítico para determinar os efeitos do BTCl e PCHY na lise de hemácias segundo protocolo descrito (NASCIMENTO et al., 2007). Sessenta μL de sangue, obtidos do Hemocentro de Brasília, foram homogeneizados em 3 mL de tampão de ensaio (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2) e centrifugados a 750 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Esse procedimento de lavagem foi repetido 3 vezes. As hemáceas foram novamente homogeneizadas em 3 mL de tampão de ensaio. Diferentes concentrações dos inibidores foram adicionados ao tampão de ensaio e ao sangue, na proporção de 1:1:1 (v/v/v), e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 750 g por 2 minutos. Cem μL do sobrenadante das amostras foram depositados em placa de 96 poços e tiveram sua absorvância analisada em comprimento de onda de 405 nm. Foi utilizado uma solução de Triton X-100 1% (v/v) como controle positivo.

4.12 Determinação do pH do meio de cultura

A determinação do pH do meio de cultura contendo BTCl ou peptídeos derivados foi realizada para avaliar se a adição de determinadas concentrações dessas moléculas eram capazes de alterar o pH e, assim, induzir alterações indiretas na proliferação e viabilidade celular.

Após o período de incubação (ver item 4.8), gotas do meio de cultura de cada grupo experimental foram depositadas sobre um papel indicador de pH. Em seguida, a coloração indicadora dos papéis foi comparada entre os grupos.

4.13 Análise estatística

Os dados referentes aos experimentos realizados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A determinação das diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos testes avaliados foi feita por análise de variância (ANOVA) com teste estatístico de Tukey, utilizando-se o software R! versão 2.4.1, com $p < 0,01$ considerado significativo.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Purificação e pureza de BTCI

A figura 11 mostra o cromatograma obtido no processo de purificação do inibidor de serinoproteases BTCI a partir de extrato bruto de sementes de *Vigna unguiculata*. O gráfico apresenta picos bem delimitados e pontos não dispersos. O BTCI foi eluído entre as frações 160 e 180. O rendimento da purificação de BTCI foi variável. A partir de 500 g de sementes de *V. unguiculata*, foi possível obter cerca de 6 a 12 mg de BTCI puro.

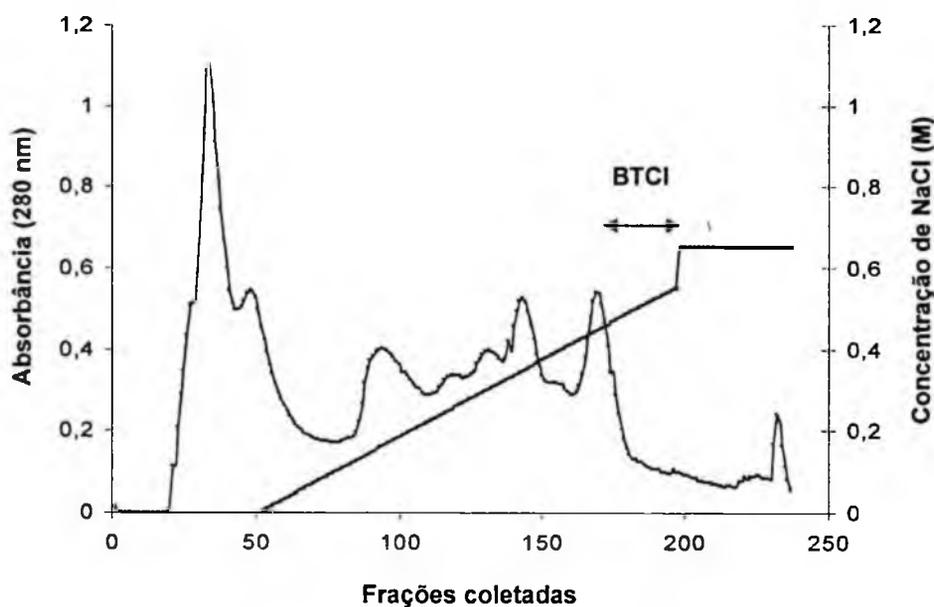


Figura 11. Purificação do inibidor de proteases BTCI por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) a partir do extrato bruto obtido de sementes de *Vigna unguiculata*. O BTCI foi eluído entre as frações 160 e 180.

Após a diálise e liofilização, as frações cromatográficas referentes ao BTCI foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS) para a verificação do grau de pureza do material cromatografado. A figura 12 mostra que o BTCI está puro e apresenta massa molecular de 9105,926 Da.

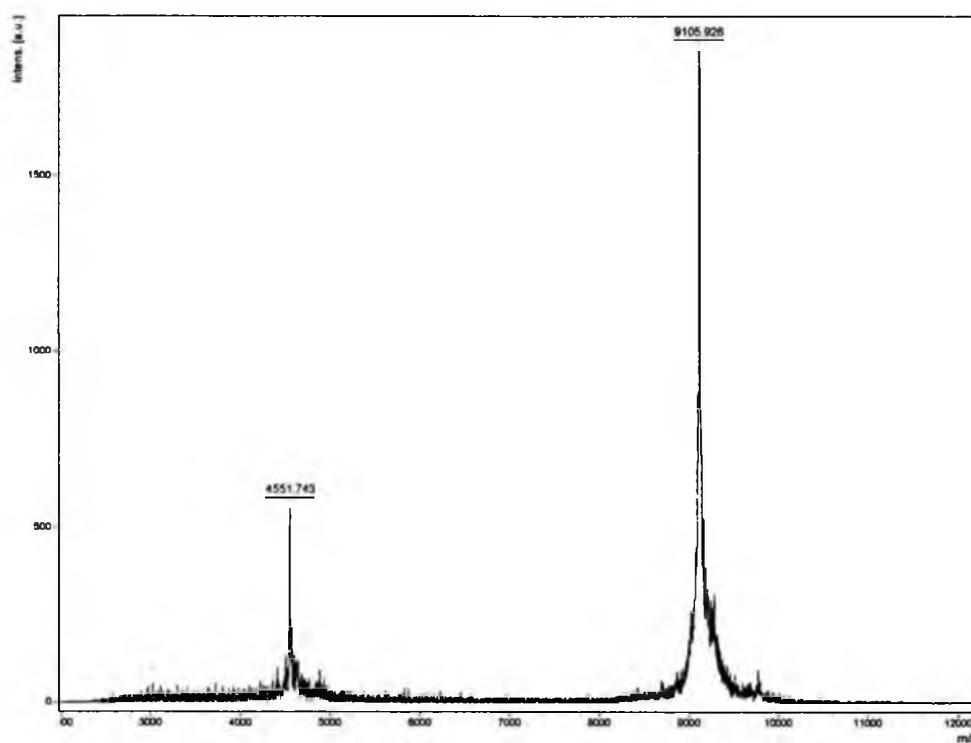


Figura 12. Avaliação do grau de pureza de BTCI. O espectro de MALDI-TOF/MS mostra os picos de 9105,926 e de 4551,743 Da correspondentes às massas do BTCI e do BTCI duplamente ionizado, respectivamente.

5.2 Atividade inibitória de BTCI e de peptídeos derivados em serinoproteases

Para verificar se o BTCI mantinha a funcionalidade após o processo de purificação, sua atividade inibitória contra tripsina e quimotripsina foram avaliadas. Além disso, avaliamos a atividade inibitória dos peptídeos derivados de BTCI (PCHY e PTRY) para verificar se os peptídeos apresentavam a atividade inibitória existente na molécula original, e se essa atividade era específica para tripsina ou quimotripsina (Figura 13).

O BTCI utilizado no estudo manteve sua atividade inibitória para as serinoproteases, e os peptídeos derivados apresentaram uma atividade inibitória seletiva, sendo que o PCHY inibiu somente a quimotripsina e o PTRY apenas a tripsina.

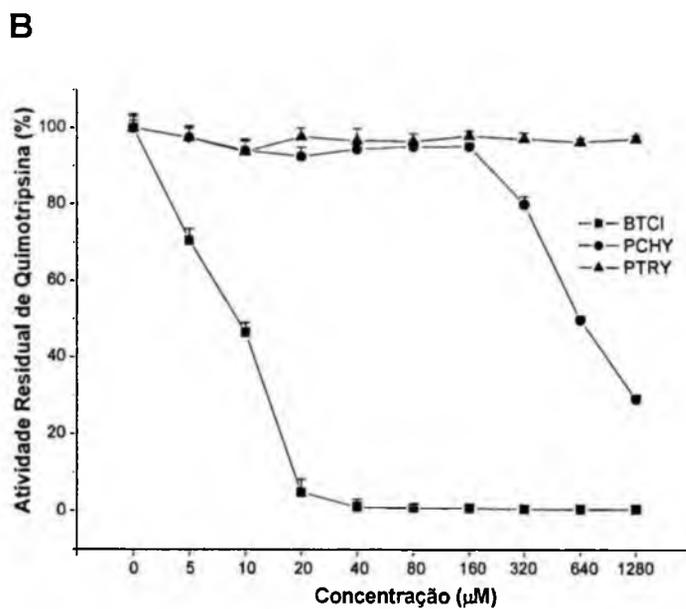
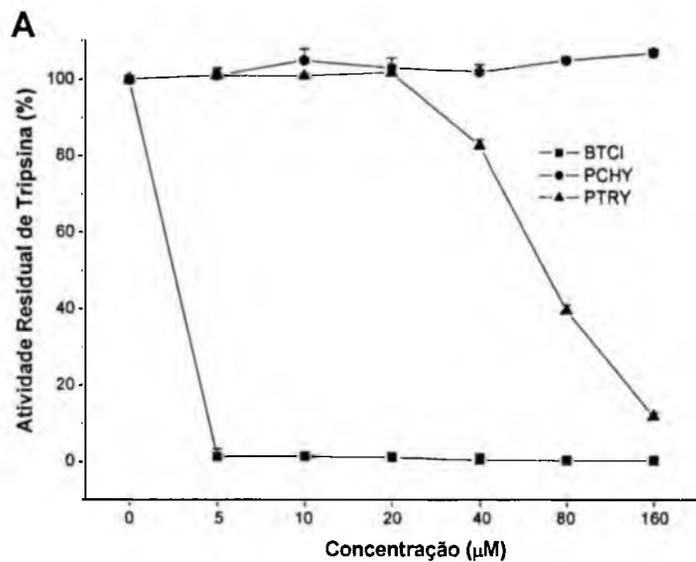


Figura 13. Atividade inibitória de BTCI e dos peptídeos derivados do mesmo, PCHY e PTRY. A) Atividade residual de tripsina. B) Atividade residual de quimotripsina.

5.3 Viabilidade celular de células MCF-7 na presença de BTCI e de peptídeos derivados

O efeito do BTCI, PCHY e PTRY na viabilidade de células MCF-7 está representado na figura 14. A presença de 200 e 400 μM de BTCI por 72 horas reduziram significativamente a viabilidade de células MCF-7 (50 e 80%, respectivamente; $p < 0,01$). Resultados semelhantes foram observados com PCHY, que reduziu significativamente a viabilidade de células MCF-7 após 72 horas de incubação (65%, $p < 0,01$). Diferentemente, o PTRY teve baixo efeito na viabilidade celular com redução de apenas 15%. Células MCF-7 tratadas com 400 μM de albumina sérica bovina (BSA) não apresentaram alteração na viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle.

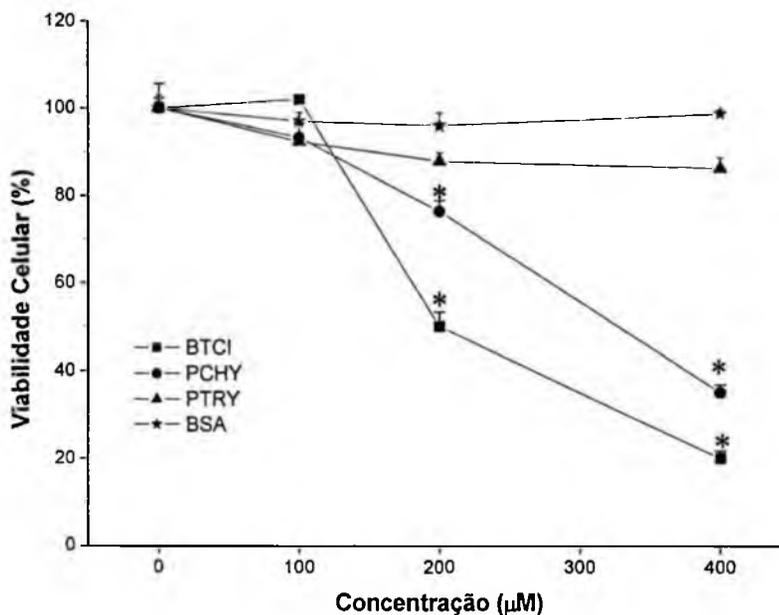


Figura 14. Viabilidade de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI e peptídeos derivados, PCHY e PTRY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. Ensaio de viabilidade por MTT. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$.

5.4 Efeitos de BTCl e PCHY na proliferação de células MCF-7

Para analisar a hipótese de que o BTCl ou PCHY induzem alterações na proliferação celular foram avaliados os efeitos dessas moléculas no número de células e no ciclo celular. Após 72 horas de incubação, o BTCl e PCHY reduziram significativamente o número de células MCF-7 (89 e 140×10^4 células/mL, respectivamente; $p < 0,01$). Células tratadas com $400 \mu\text{M}$ de BSA não apresentaram redução significativa em seu número quando comparadas ao grupo controle (Figura 15).

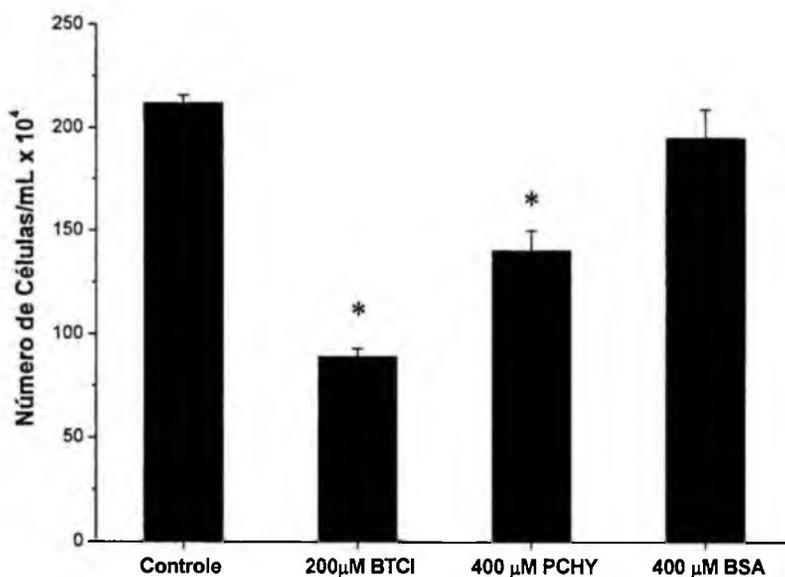


Figura 15. Número de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. Esse resultado foi obtido por meio da contagem total das células em câmara de Neubauer após o tempo de incubação. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$.

A proporção de células nas fases do ciclo celular tratadas com BTCI ou PCHY foi significativamente alterada. Considerando-se apenas a população celular com DNA não fragmentado, A proporção de células tratadas com BTCI reduziu para 59% na fase G1, enquanto que nas fases S e G2 aumentou para 24 e 17% ($p < 0,01$), respectivamente. Semelhantemente ao BTCI, a proporção de células MCF-7 tratadas com PCHY reduziu significativamente para 53%, enquanto que nas fases S e G2 aumentou para 23 e 24% ($p < 0,01$), respectivamente (Figura 16).

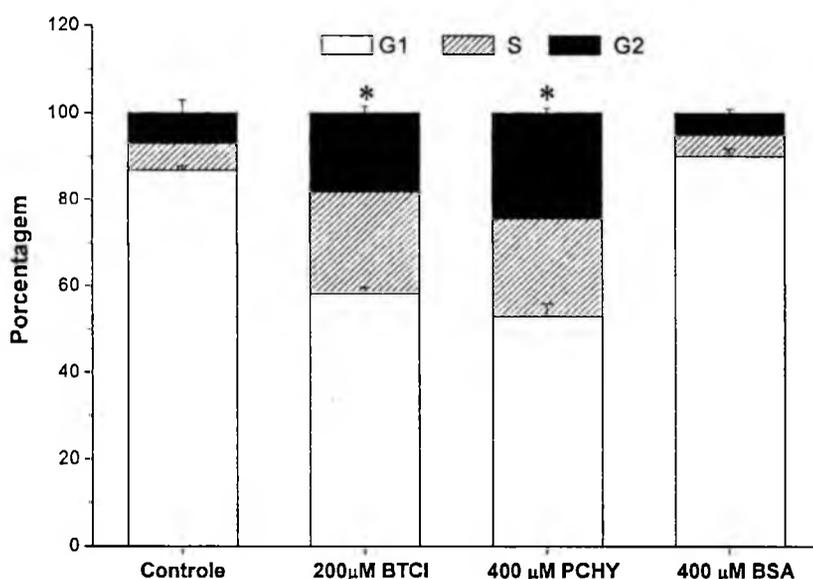


Figura 16. Ciclo celular de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. O DNA das células tratadas foi corado com iodeto de propídeo e analisado por citometria de fluxo. O cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular foi realizado considerando-se apenas as células com DNA não fragmentado * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$.

Em seguida, os efeitos de BTCI e PCHY em estruturas celulares importantes como o DNA, a mitocôndria, a membrana plasmática e a morfologia celular foram analisados.

5.5 Material genético e morfologia nuclear de células MCF-7 na presença de BTCl ou PCHY

Os efeitos de BTCl e PCHY na fragmentação de DNA de células MCF-7 estão representados na figura 17. A presença de BTCl na concentração de 200 μM aumentou significativamente (76%, $p < 0,01$) a fragmentação de DNA de células MCF-7. O PCHY apresentou efeito semelhante nas células aumentando significativamente (56%, $p < 0,01$) a fragmentação de DNA. Células tratadas com 400 μM de BSA não apresentaram alterações na fragmentação de DNA quando comparadas ao grupo controle.

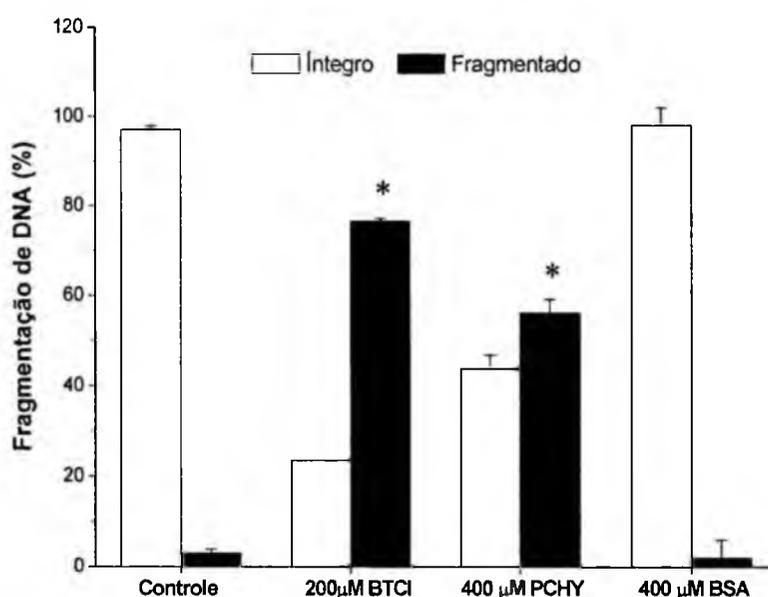


Figura 17. Fragmentação de DNA de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. O DNA das células tratadas foi corado com iodeto de propídeo e analisado por citometria de fluxo. * diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,01$.

Os efeitos de BTCl e de PCHY na morfologia do núcleo de células MCF-7 estão representados na figura 18. Na presença de BTCl ou PCHY, observa-se alterações como: células menores que o controle; núcleos não esféricos; condensação de cromatina; DNA fragmentado e distribuído aleatoriamente pelo núcleo.

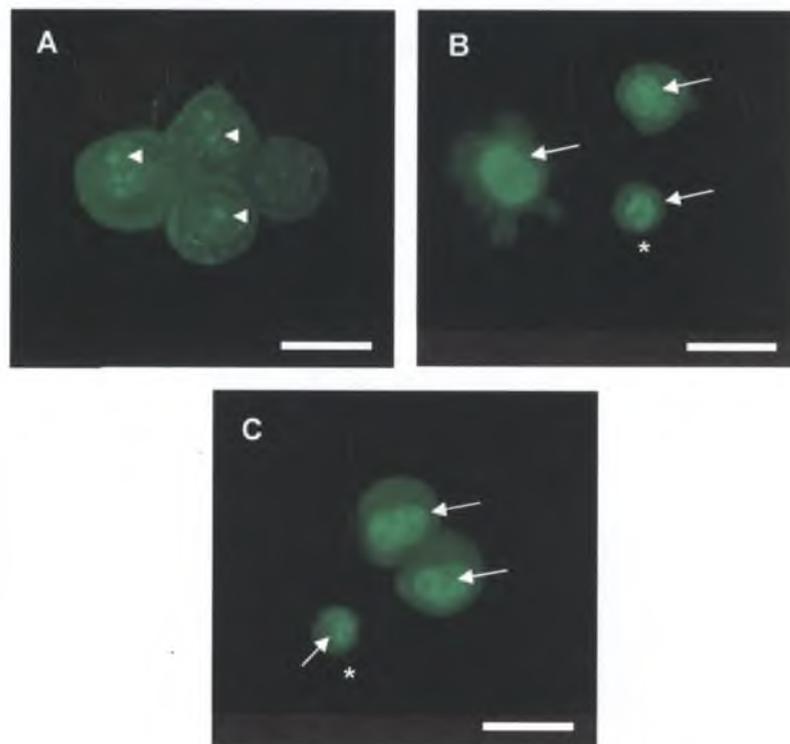


Figura 18. Morfologia do núcleo de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação. Após o tratamento, as células foram coradas com laranja de acridina e analisadas em microscópio de fluorescência. A) Grupo controle. B) 200 μ M de BTCl. C) 400 μ M de PCHY. Legendas: nucléolo (cabeça de seta); condensação da cromatina (seta); células menores que o controle (*). Barra: 30 μ m.

5.6 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células MCF-7 na presença de BTCI ou PCHY

O tratamento com 200 μM de BTCI por 72 horas alterou significativamente (71%, $p < 0,01$) o $\Delta\Psi_m$ de células MCF-7. Células MCF-7, na presença de 400 μM de PCHY, também mostraram uma alteração significativa no $\Delta\Psi_m$ (62%, $p < 0,01$). Células tratadas com 400 μM de BSA não apresentaram alterações no $\Delta\Psi_m$ quando comparadas ao grupo controle (Figura 19).

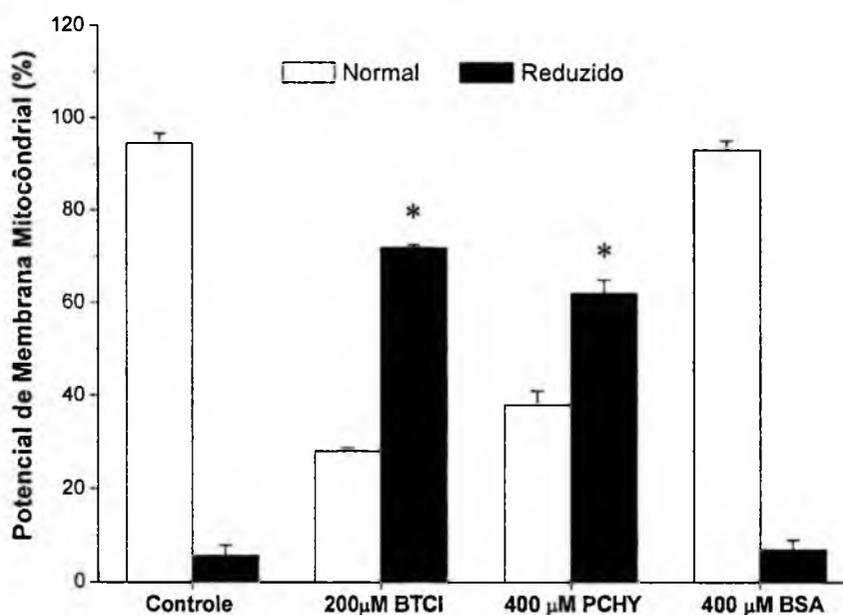


Figura 19. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. As células tratadas foram coradas com rodamina 123 e, em seguida, o $\Delta\Psi_m$ foi analisado por citometria de fluxo * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$.

5.7 Integridade da membrana plasmática de células MCF-7 na presença de BTCI ou PCHY

O efeito de BTCI ou de PCHY na integridade da membrana plasmática de células MCF-7 está representado na figura 20. A presença de BTCI na concentração de 200 μM alterou significativamente (40%, $p < 0,01$) a integridade da membrana plasmática de células MCF-7. Resultados semelhantes foram observados com PCHY, que reduziu significativamente (47%, $p < 0,01$) a integridade da membrana plasmática de células MCF-7 após 72 horas de incubação. Células tratadas com 400 μM de BSA não apresentaram alterações na integridade da membrana plasmática quando comparadas ao grupo controle (Figura 20).

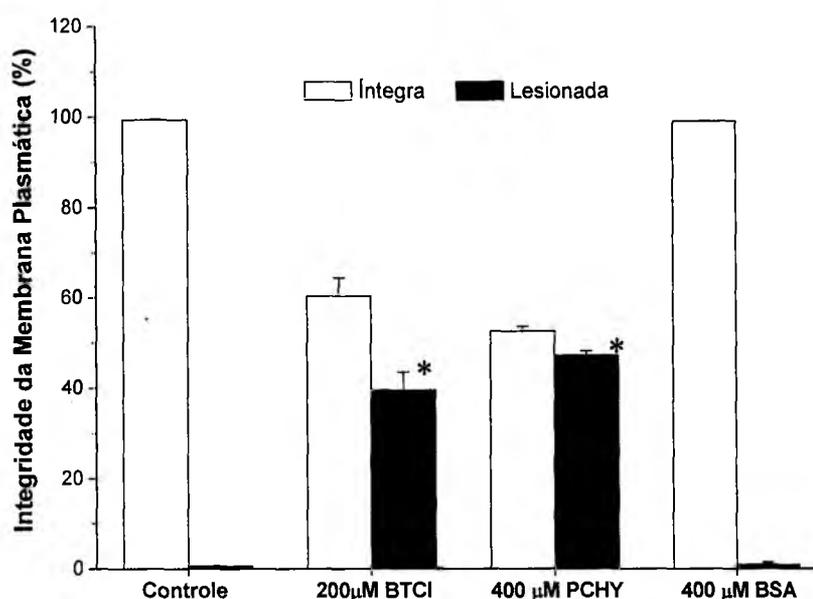


Figura 20. Integridade da membrana plasmática de células de câncer de mama (MCF-7) na ausência ou presença do BTCI ou PCHY após 72 horas de incubação. BSA: albumina sérica bovina. Após o tratamento, as células foram incubadas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer. Células coradas de azul apresentam a membrana plasmática lesionada. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$.

5.8 Morfologia de células MCF-7 na presença de BTCl ou PCHY

A morfologia das células MCF-7, analisadas por microscopia de luz, na ausência ou presença de BTCl ou PCHY está ilustrada na figura 21.

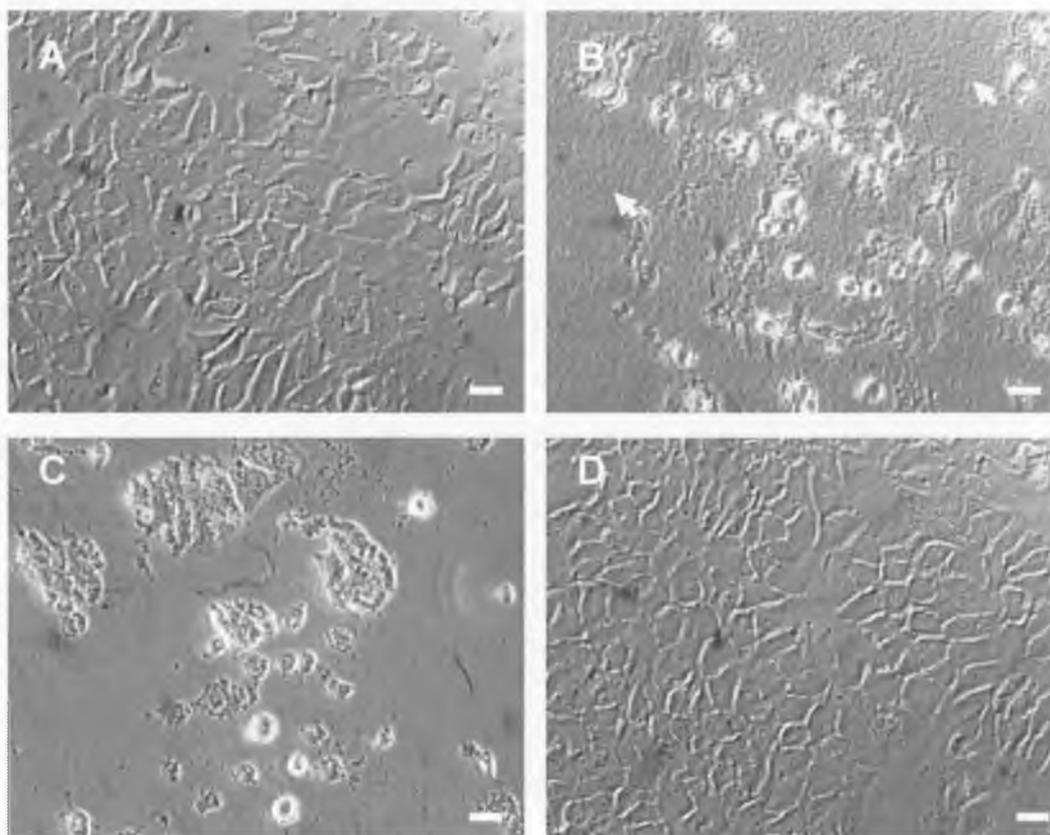


Figura 21. Fotomicrografias de células de câncer de mama (MCF-7) na presença do inibidor de proteases BTCl ou de PCHY após 72 horas de incubação. A) Grupo controle . B) 200 μ M de BTCl. C) 400 μ M de PCHY D) 400 μ M BSA. Seta: agregação protéica. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase. Barra = 30 μ m.

As células MCF-7 do grupo controle apresentaram forma poligonal, alguns grânulos no citoplasma e projeções citoplasmáticas que ligam uma célula à outra. O núcleo das células eram esféricos e um ou mais nucléolos estavam evidentes. Além disso, as células formaram colônias e estavam firmemente aderidas à placa de cultura, mostrando, portanto, uma morfologia normal para essa linhagem (Figura 21 A).

No entanto, células MCF-7 incubadas na presença de BTCI apresentaram alterações morfológicas significativas quando comparadas ao grupo controle. A forma celular era disforme, apresentava tamanho reduzido, não havia projeções citoplasmáticas entre as células e o núcleo celular não estava evidente. Desaderência das células da placa de cultura e fragmentos celulares também foram observados. Além disso, observou-se agregados protéicos evidentes e homoganeamente dispersos no meio de cultura (Figura 21 B).

As células MCF-7 incubadas na presença de PCHY (Figura 21 C) apresentaram aspectos morfológicos significativamente diferentes do controle e semelhantes aos descritos para as células tratadas com BTCI. No entanto, não foi observada nenhuma agregação protéica no meio de cultura.

As células também tiveram sua morfologia avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 22 e 23). Células tratadas com BTCI e PCHY apresentaram aspectos morfológicos semelhantes entre si, mas distintos em relação ao grupo controle. Os aspectos observados foram: fragmentação nuclear, desorganização do citoplasma, mitocôndrias inchadas e excesso de fragmentos celulares. Interessantemente, foi observado também a presença de estruturas envolvidas em um processo denominado autofagia: autofagossomos e lisossomos.

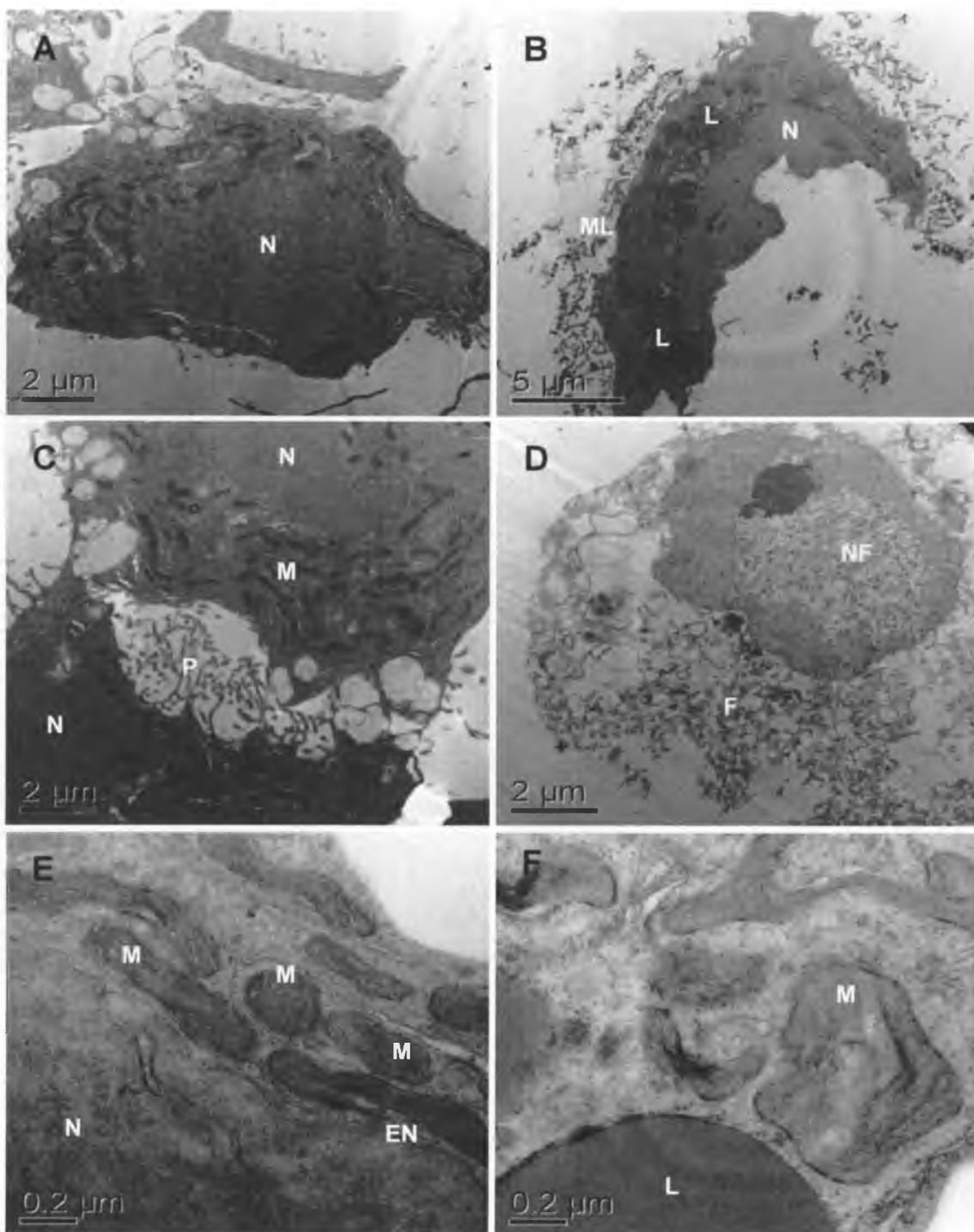


Figura 22. Ultra-estrutura de células de câncer de mama (MCF-7) na presença de BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. A, C e E) Grupo controle. B, D e F) 200 μM de BTCl ou 400 μM de PCHY. N: núcleo; EN: envoltório nuclear; FN: fragmentação nuclear; M: mitocôndria; L: lisossomo; F: fragmentos celulares; ML: membrana plasmática lesionada.

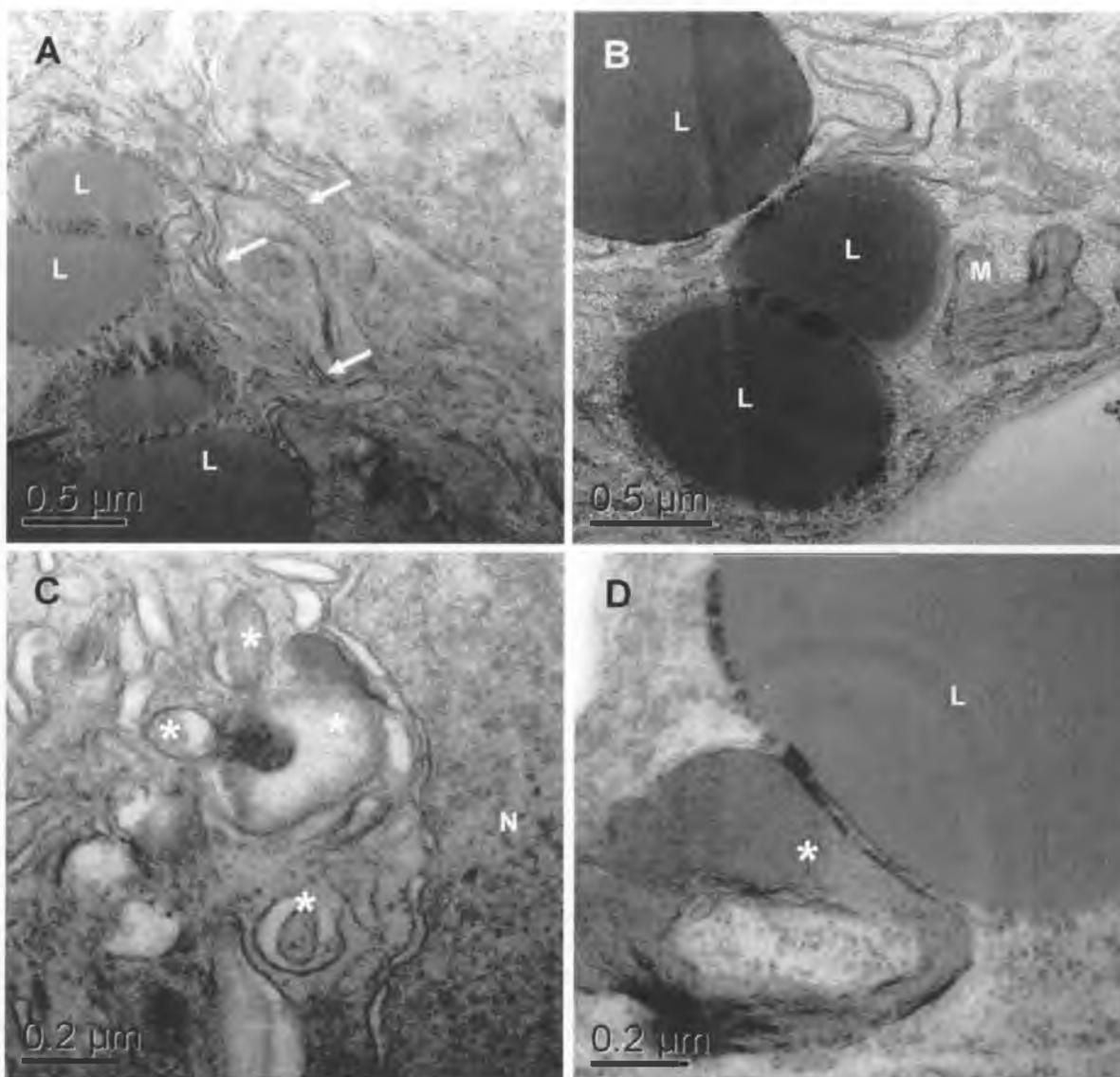


Figura 23. Ultra-estrutura de células de câncer de mama (MCF-7) na presença de BTCl ou PCHY após 72 horas de incubação avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Presença de estruturas envolvidas no processo de autofagia. A, B, C e D: grupo tratado com BTCl ou PCHY. N: núcleo; M: mitocôndria; L: lisossomo; *: autofagossomos; seta: fragmentos de membranas desorganizadas.

Além da morfologia, aspectos de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) das células foram analisadas por citometria de fluxo (Figura 24). A população de células tratadas com BTCI e PCHY mostraram granulosidade e tamanho reduzidos quando comparados ao grupo controle.

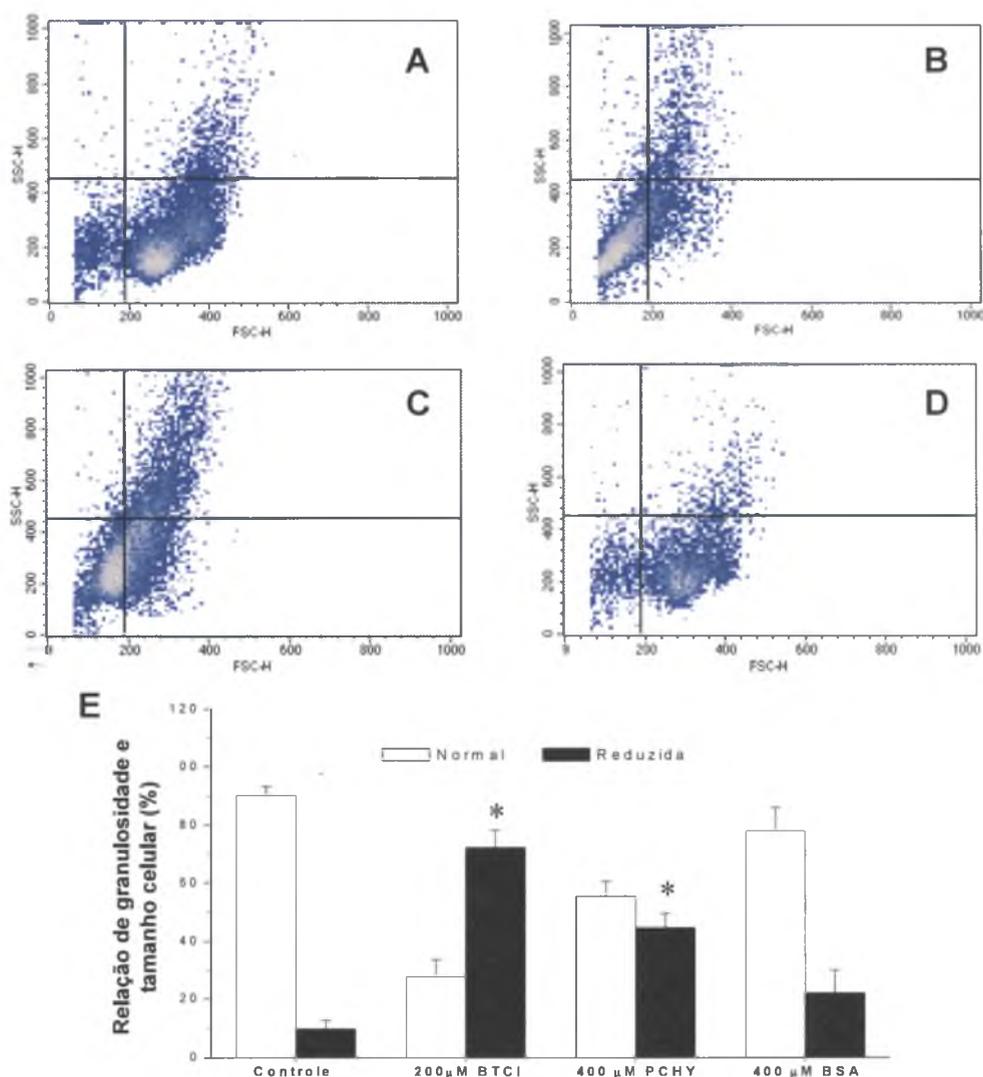


Figura 24. Relação de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) de células de câncer de mama (MCF-7) na presença de BTCI ou PCHY após 72 horas de incubação. Essa relação foi obtida após análise das células por citometria de fluxo. A) Grupo controle. B) 200 μM de BTCI. C) 400 μM de PCHY. D) 400 μM de BSA. E) Representação gráfica das figuras A, B, C, D. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$.

5.9 Efeitos de BTCI ou PCHY em células não tumorais

Os efeitos da incubação de BTCI em células não tumorais estão representados nas figuras 25 e 26. Nesse experimento, foram utilizadas as mesmas concentrações de BTCI e PCHY que foram citotóxicas para as células tumorais de câncer de mama: 200 μ M e 400 μ M, respectivamente. A presença de BTCI ou PCHY não induziu a lise hemácias (Figura 25).

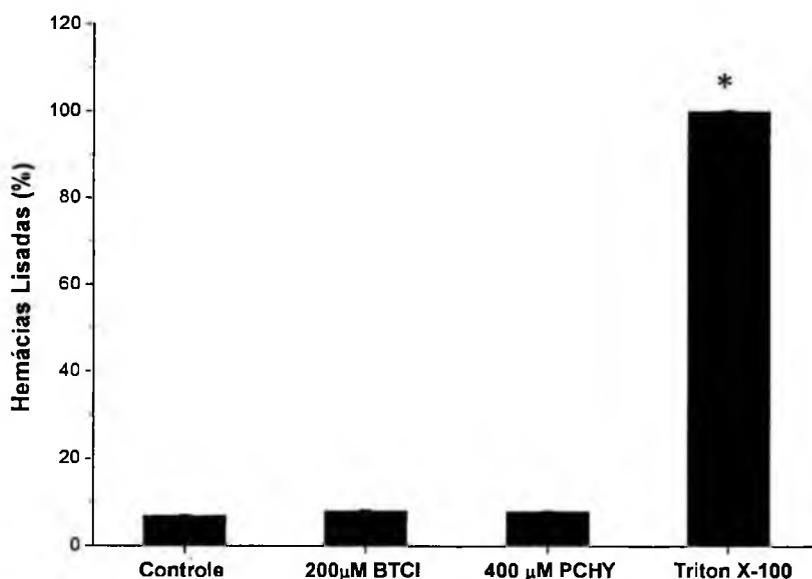


Figura 25. Efeitos de BTCI ou de PCHY na lise de hemácias. Controle positivo: Triton-X 100 1%. A proporção de lise de hemácias incubadas com BTCI ou PCHY foi obtida após análise de absorbância do sobrenadante em 405 nm. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$.

A viabilidade celular de fibroblastos foi significativamente reduzida (90%, $p < 0,01$) quando esses foram tratados com BTCI. No entanto, surpreendentemente, a viabilidade dos fibroblastos não sofreu alteração quando foram tratados com PCHY (Figura 26).

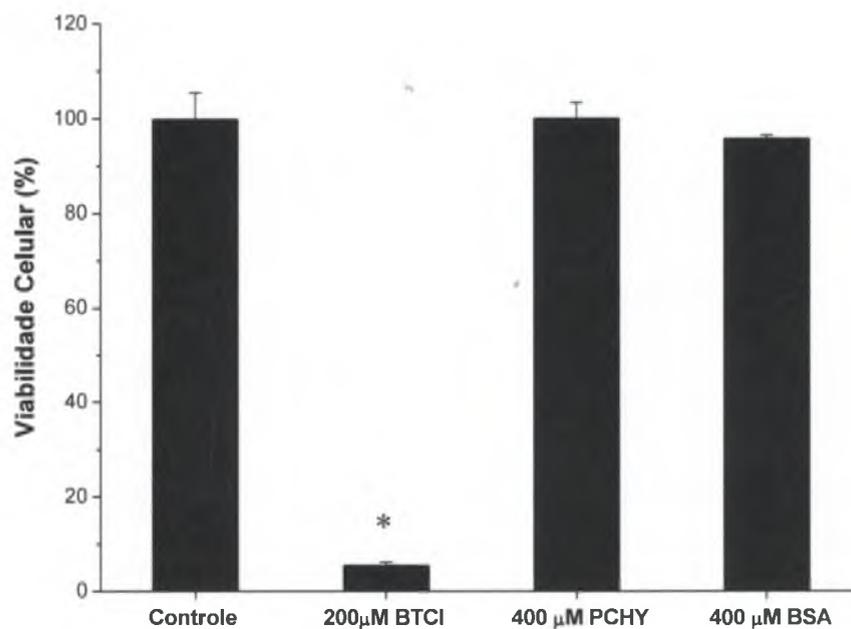


Figura 26. Efeitos de BTCI ou de PCHY na viabilidade de fibroblastos. Ensaio de viabilidade por MTT. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,01$.

5.10 pH do meio de cultura na presença de BTCI ou de PCHY

A adição de 200 µM de BTCI ou de 400 µM de PCHY no meio de cultura não causou alteração significativa no valor do pH, mantendo-se na faixa semelhante ao controle: 7 (Figura 27).

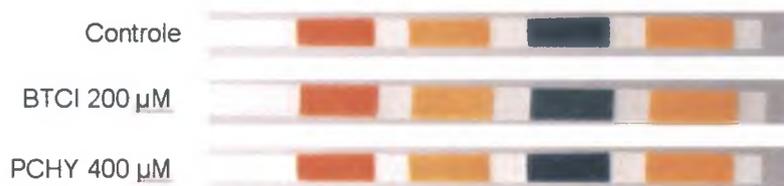


Figura 27. Efeitos do BTCI ou de PCHY no pH do meio de cultura. Após o período de tratamento, os meios de cultura foram depositados sobre papel indicador de pH e comparados entre si. Faixa de pH = 7.

5.11 Quadro resumo dos resultados do tratamento de BTCI e PCHY em células MCF-7 e não tumorais.

→ Células Câncer de Mama (MCF-7)

		BTCI	PCHY
Proliferação	Número de Células	↓	↓
	Ciclo Celular	A.	A.
Morte Celular	Viabilidade Celular	↓	↓
	Fragmentação de DNA	↑	↑
	Morfologia Nuclear	A.	A.
	Potencial de membrana mitocondrial	↓	↓
	Integridade da membrana plasmática	↓	↓
	Morfologia Celular	A.	A.
	Granulosidade e tamanho celular	↓	↓

→ Células não-tumorais

		BTCI	PCHY
Hemácias	Lise	N.A.	N.A.
Fibroblastos	Viabilidade	A.	N.A.

Legenda: A.: Alterado
N.A.: Não alterado

6. DISCUSSÃO

O câncer é uma doença que vem aumentando suas taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo. O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais frequentes em mulheres. Também é reponsável pelas maiores taxas de mortalidade em mulheres quando comparado a outros tipos de câncer (PARKIN et al., 2005; INCA, 2007). Atualmente, os tratamentos existentes para o câncer de mama têm efeito moderado e causam efeitos colaterais severos que diminuem a qualidade de vida do paciente (NIH, 2005). Além disso, muitos desses tratamentos tiveram sua eficiência reduzida devido à resistência adquirida pelas células tumorais (IGNEY et al., 2002).

Atualmente, há uma busca constante por novos tratamentos e moléculas anticarcinogênicas eficientes e não indutoras de efeitos colaterais severos. Diversos compostos purificados de plantas vêm sendo avaliados para esse fim. Dentre esses compostos, destacam-se os inibidores de protease da família Bowman-Birk. No presente trabalho, os efeitos do inibidor de proteases da família Bowman-Birk BTCl e de peptídeos sintéticos derivados foram avaliados em células de câncer de mama (MCF-7).

Os resultados mostraram que o tratamento de células MCF-7 com BTCl ou com o peptídeo PCHY induziu significativa redução dose-dependente na viabilidade celular após 72 horas de incubação. Por outro lado, o peptídeo PTRY apresentou baixo efeito na redução da viabilidade celular (Figura 14). A redução da viabilidade celular analisada pela metabolização de MTT indica três possíveis hipóteses: ao longo do período de incubação, o BTCl ou o peptídeo PCHY poderiam induzir (1) redução da proliferação celular ou (2) morte celular ou (3) ambos simultaneamente.

O controle da proliferação celular em células tumorais é considerado uma eficiente estratégia para prevenir ou retardar o crescimento tumoral (MOLINARI, 2000). Efeitos citostáticos de inibidores de IPBBIs em células tumorais cultivadas *in vitro* já foram descritos na literatura. Tais efeitos foram observados em células de câncer de próstata (KENNEDY et al., 2002), ovário (WAN et al., 1998), mama (ZHANG et al., 1999; CHEN et al., 2005), cólon (CLEMENTE et al., 2005), osteosarcoma (SAITO et al., 2007), boca (ZHANG et al., 1999) e outros (KENNEDY et al., 1998 b).

Nesse trabalho, observou-se que o número de células diminuiu significativamente após tratamento com BTCI ou com peptídeo PCHY (Figura 15). Tais dados mostram que essas moléculas estão relacionadas na redução da proliferação celular. Para melhor investigar esse efeito, o ciclo celular de células MCF-7 foi avaliado (Figura 16).

A progressão do ciclo celular de células eucarióticas envolve a ativação sequencial de quinases (Cdks) que são dependentes da associação com suas respectivas ciclinas regulatórias. O bloqueio de uma das fases do ciclo celular está relacionado com alterações na ativação/inibição das moléculas responsáveis pela regulação do ciclo. A expressão dos inibidores dos complexos regulatórios nas fases de transição G1/S e G2/M, como as proteínas p27 e p 21 respectivamente, induzem um bloqueio na progressão do ciclo celular (MOLINARI, 2000; DESHPANDE et al., 2005).

O BTCI e o peptídeo PCHY induziram alterações no ciclo celular diminuindo a proporção de células na fase G1 e aumentando significativamente a proporção de células nas fases S e G2/M do ciclo celular, confirmando assim seus efeitos citostáticos em células MCF-7 (Figura 16). Outros IPBBIs apresentaram efeitos citostáticos no ciclo celular de células de osteosarcoma, diminuindo a expressão de ciclinas e aumentando

a expressão de reguladores como p21 e p27 (SAITO et al., 2007). Um exemplo é o inibidor BBI clássico que teve um efeito significativo na redução da proliferação de células MCF-7 (CHEN et al., 2005). Esse inibidor induziu uma redução nos níveis das ciclinas D e E e o aumento na produção das proteínas p21 e p27, culminando no bloqueio da fase G1 do ciclo celular. Portanto, é provável que, direta ou indiretamente, o BTC1 e o peptídeo PCHY estejam relacionados com alterações na expressão e/ou atividade das proteínas regulatórias do ciclo celular nas fases S e G2/M, como as ciclinas e suas moléculas reguladoras p21 e p27.

Os efeitos citotóxicos de IPBBIs em células tumorais não estão entre os efeitos frequentemente observados. Muitos trabalhos que avaliam IPBBIs em células tumorais relatam efeitos significativos na proliferação celular, e leve ou nenhum efeito na morte celular (WAN et al., 1998; ZHANG et al., 1999; CLEMENTE et al., 2005; CHEN et al., 2005; SAITO et al., 2007). No presente trabalho, entretanto, efeitos citotóxicos significativos de BTC1 ou PCHY foram observados em diversas estruturas celulares.

Os ensaios relacionados à integridade do material genético mostraram que o BTC1 e o peptídeo PCHY induziram severa fragmentação de DNA em células MCF-7 (Figura 17). Condensação da cromatina e fragmentos de DNA também foram observados com a análise da morfologia nuclear por alaranjado de acridina (Figura 18). A fragmentação de DNA é uma característica marcante no processo apoptótico desencadeado após a ativação de caspases, que ativam endonucleases contribuindo para a intensa fragmentação de DNA e condensação da cromatina (SAVILL et al., 2000).

A mitocôndria tem um importante papel na apoptose. O inchaço, aumento de tamanho e desregulação do potencial de membrana de mitocôndrias estão relacionados

a um aumento na permeabilidade da mesma e liberação de moléculas sinalizadoras de apoptose para o citoplasma (GREEN et al., 1998; DEBATIN et al., 2002). Por exemplo: sabe-se que o aumento na expressão de moléculas pró-apoptóticas e/ou a baixa expressão de moléculas anti-apoptóticas causam uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial e a liberação de citocromo c para o citosol, ativando assim o processo apoptótico pela via intrínseca (KLUCK et al., 1999; IGNEY et al., 2002).

No presente trabalho, observou-se que o tratamento com BTC1 e com o peptídeo PCHY desencadeou uma diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial (Figura 19) e um aumento de tamanho de mitocôndrias (Figuras 22 e 23), sugerindo que sua citotoxicidade pode ser induzida por apoptose. DEBATIN e colaboradores (2002) enfatizam, no entanto, que o simples fato de uma molécula induzir alterações na mitocôndria não indica que ela atue diretamente nessa organela. É importante lembrar que muitos estímulos apoptóticos causam alterações na mitocôndria tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca. Dessa forma, outros experimentos são necessários para avaliar o exato mecanismo da ação do BTC1 e do peptídeo PCHY nas mitocôndrias de células MCF-7.

Alterações na estrutura e na função de transporte da membrana plasmática não são observadas em células que se encontram em apoptose inicial (MAJNO, 1995). Geralmente, a alteração na membrana plasmática é uma característica atribuída ao tipo de morte celular denominado necrose. Resumidamente, a necrose inicia com danos físicos severos à célula, levando à ruptura abrupta da membrana plasmática e à liberação do seu conteúdo citoplasmático (MAJNO, 1995). No entanto, é preciso ter cautela ao associar essa característica somente à necrose. Células em estágios avançados de apoptose são semelhantes as células necróticas. Essa semelhança é de

tal ordem que alguns autores sugeriram um termo para caracterizar esse estágio: “necrose apoptótica” (MAJNO, 1995). Sendo assim, células na fase final da apoptose também apresentam alterações na estrutura e na função de transporte da membrana plasmática (LEIST et al., 2001).

Neste trabalho, parte das células MCF-7 tratadas com BTC1 ou com o peptídeo PCHY tiveram a integridade da membrana plasmática danificada (Figuras 20 e 22). Considerando que a maioria das células tratadas apresentaram características apoptóticas nos outros parâmetros celulares avaliados acima, e que o tempo de incubação experimental foi de três dias, pode-se hipotetizar que as alterações observadas na membrana plasmática de células MCF-7 são efeito da apoptose dessas células em fase tardia.

Testes realizados por citometria de fluxo como os utilizados para analisar os parâmetros descritos acima, são métodos rápidos para avaliar diversas características de morte celular. No entanto, é importante que os dados desses testes sejam sempre confirmados e correlacionados com a morfologia celular (contraste de fase ou eletrônica). A morfologia de células apoptóticas é caracterizada pela desidratação e redução do volume e granulosidade celular, ondulações na membrana plasmática, aumento do volume mitocôndrial e condensação do material genético (MAJNO, 1995; DARZYNKIEWICZ et al., 1997). Nesse trabalho, a morfologia das células MCF-7 tratadas com BTC1 ou com o peptídeo PCHY foi significativamente alterada (Figuras 21, 22, 23 e 24), apresentando alterações típicas de apoptose.

Além das características morfológicas semelhantes às descritas para apoptose, também foram observados o aumento do número e tamanho de lisossomos, a presença de vesículas com bicamada lipídica próximas dos lisossomos, membranas

desorganizadas ao longo do citoplasma e degradação da membrana plasmática em células tratadas com BTCl ou PCHY (Figura 22 e 23). Essas alterações morfológicas são características da ativação do mecanismo de autofagia. A autofagia é uma via de degradação de proteínas e/ou organelas supérfluas ou defeituosas, responsável por minimizar o acúmulo e agregação das mesmas no citoplasma (MARINO et al., 2004; MEIJER et al., 2004; KONDO et al., 2005; MOTYL et al., 2006; LUZIO et al., 2007). Consiste na compartimentalização das proteínas e/ou organelas a serem degradadas por uma bicamada lipídica denominada de autofagossomo. Os autofagossomos contendo as moléculas a serem degradadas fundem-se aos lisossomos, onde ocorre a degradação das moléculas e da camada lipídica interna do autofagossomo por enzimas proteolíticas, formando um autofagolisossomo. É um processo conservado ao longo da evolução e ocorre em todos os organismos eucarióticos. Esse mecanismo geralmente é ativado quando a célula está submetida em condições adversas como falta de nutrientes ou infecção por patógenos com o objetivo de regular a homeostase celular (KLIONSKY et al., 2000; LEVINE et al., 2004; MEIJER et al., 2004).

Estudos sobre o papel da autofagia no câncer estão em fase inicial. Sabe-se que a autofagia pode tanto servir como um processo de proteção/sobrevivência da célula exposta a condições adversas (tratamentos anticarcinogênicos, por exemplo) quanto induzir a morte celular. No entanto, os mecanismos que determinam um desses dois destinos celulares ainda não foram elucidados (KONDO et al., 2005; RUBINSZTEIN et al., 2007). Postula-se que autofagia atue na remoção de proteínas e organelas degradadas pelos tratamentos anticarcinogênicos, promovendo uma rápida reciclagem desses componentes para manter a célula viva. Porém, o excesso de degradação dos

componentes citoplasmáticos pode induzir a célula à morte (LIANG et al., 1999; MOTYL et al., 2006).

Alguns estudos mostram evidências de que a autofagia e a apoptose são processos evolutivamente relacionados (SCHWARTZ et al., 1993; MARINO et al., 2004). Ambos processos apresentam moléculas e vias intracelulares de ativação em comum (KONDO et al., 2005; MOTYL et al., 2006). O lisossomo e seu conteúdo enzimático é considerado um exemplo de organela em comum tanto para a autofagia como para a indução de apoptose, sendo importante para os dois processos. Na autofagia o autofagossomo funde-se ao lisossomo onde ocorre a degradação dos componentes; na apoptose, as catepsinas liberadas do lisossomo promovem a ativação da cascata de degradação intracelular (CIRMAN et al., 2004; LUZIO et al., 2007). Análises morfológicas de células de câncer de mama expostas, separadamente, aos agentes anticarcinogênicos tamoxifen e camptotecina mostraram que haviam células mortas apresentando tanto características de autofagia quanto de apoptose (BURSCH et al., 1996; KONDO et al., 2005; MOTYL et al., 2006). Dependendo do tipo de câncer e da natureza do agente anticarcinogênico, a autofagia pode atuar como um processo indispensável para preceder e ativar o mecanismo de apoptose em células MCF-7 (CUI et al., 2007).

A morte celular pode ser melhor avaliada quando mais de um ensaio citológico é realizado. Portanto, análises da integridade da membrana citoplasmática, do potencial de membrana mitocondrial, da integridade do DNA e da morfologia fornecem pistas mais confiáveis para avaliar o tipo de morte celular induzido por determinado agente (DARZYNKIEWICZ et al., 1997). As alterações de diversas estruturas celulares induzidas pelo BTCl e pelo peptídeo PCHY mostram seus efeitos citotóxicos em células

MCF-7 e sugerem que essa citotoxicidade foi induzida pela via de morte celular da apoptose associada a ativação do processo de autofagia. Além da citotoxicidade, efeitos citostáticos também foram observados, mostrando que o efeito anticarcinogênico do BTCl e do peptídeo PCHY também está relacionado à inibição da proliferação celular.

Para garantir que os efeitos observados nas células aconteceram em decorrência da atividade anticarcinogênica própria dos inibidores testados, alguns testes de exclusão foram realizados. A adição de determinadas concentrações de proteínas com cadeias laterais carregadas em uma solução pode afetar o pH da mesma (NELSON et al., 2004). Para excluir a possibilidade de que os efeitos de BTCl e PCHY nas células MCF-7 ocorreram por alterações no pH do meio de cultura, aferimos e comparamos essa medida entre os grupos testados. O pH dos meios de cultura contendo BTCl e PCHY não foram alterados, apresentando padrões semelhantes aos observados para o controle (Figura 27).

Além disso, avaliamos se a adição de proteínas no meio de cultura poderia alterar a osmolaridade do mesmo e induzir alterações nas células. Para isso, fizemos um outro grupo teste com adição de albumina (proteína abundante do sangue e não tóxica) na mesma concentração dos inibidores e avaliamos seus efeitos. Nenhum efeito citotóxico ou citostático foi observado nesse grupo. Tais testes de exclusão, mostraram que os efeitos observados nas células MCF-7 são realmente decorrentes da atuação dos inibidores sobre as mesmas e não induzidos por alterações no meio de cultura.

Como citado anteriormente, os efeitos citotóxicos de IPBBIs em células tumorais não estão entre os efeitos frequentemente observados. Tais resultados podem estar relacionados com a dose e o tempo de tratamento utilizados pelos grupos de pesquisa.

Alterações na proliferação celular são observadas no tratamento de células tumorais com baixas doses de IPBBIs (10 a 40 μM) e por um longo período de incubação (6 a 14 dias) (WAN et al., 1998; ZHANG et al., 1999). No presente trabalho, foi utilizado uma dose maior de BTCl e PCHY (200 e 400 μM , respectivamente) por um período de incubação de apenas três dias. Portanto, pode-se observar que essas doses induziram a alteração do ciclo celular seguida de morte em um curto período de tempo. É possível que doses baixas de IPBBIs apresentem um efeito anticarcinogênico mais lento e que o período de incubação não seja suficiente para observar a morte celular. Outra hipótese é de que os trabalhos priorizaram em identificar os efeitos anticarcinogênicos de IPBBIs apenas na proliferação celular, deixando de investigar se essa redução na proliferação ocorria apenas por efeitos citostáticos dos inibidores ou também por efeitos citotóxicos.

O IPBBIs são um dos compostos derivados da dieta mais estudados como agentes anticarcinogênicos (KELLOFF et al., 2000). Apesar dos estudos desses IPBBIs como agentes anticarcinogênicos já estarem avançados, pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação (KENNEDY, 1998 b). Alguns trabalhos mostram que o BBI pode ser internalizado por células de fibroblastos e do intestino (YAVELOW et al., 1987 b; BILLINGS et al., 1991). Foram encontrados dois receptores com atividade enzimática em membrana de fibroblastos tumorais passíveis de inibição pelo BBI clássico. Hipotetiza-se que a ligação do BBI com tais receptores aciona a internalização da molécula (YAVELOW et al., 1987 a). É possível que IPBBIs também possam atuar como moduladores de receptores ativados por proteases relacionados ao câncer presentes em diferentes tipos celulares (SCHMIDLIN et al., 2001). Em um outro

mecanismo proposto, os IPBBIs e peptídeos derivados dos mesmos poderiam transpassar a membrana plasmática, sem o auxílio de receptores (YANG et al., 2001).

No interior da célula tumoral, os IPBBIs possuem diversos alvos. Proteases estão intrinsecamente envolvidas em importantes etapas da transformação e progressão de células malignas (DARMOUL et al., 2003; NYBERG, et al., 2006), com atividade proteolítica maior do que em células normais. A utilização de IPBBIs para inibir essa atividade proteolítica exacerbada vem sendo estudada. KENNEDY (1995), MANZONE (1995) e colaboradores mostraram que o tratamento de células tumorais com BBI clássico induziu uma diminuição significativa da atividade proteolítica das mesmas, e essa diminuição foi correlacionada ao efeito anticarcinogênico preventivo já descrito para esse inibidor.

Outros mecanismos propostos estão na alteração do processamento de fatores de crescimento, receptores, maquinaria de reparo de DNA e fatores de transcrição (CLARK et al., 1993; KENNEDY, 1994; GARCIA-GASCA et al., 2002). Como exemplo, a redução na expressão dos proto-oncogenes *c-myc* e *c-fos* (genes relacionados a proliferação e resistência de drogas anticarcinogênicas) foi observada após o tratamento de células tumorais com BBI clássico (ST CLAIR et al., 1991; CHANG et al. 1993).

Alguns trabalhos atribuem a atividade anticarcinogênica de IPBBIs ao seu sítio reativo para quimotripsina (YAVELOW et al., 1985; BILLING et al., 1987; WARE et al., 1997; GUEVEN et al., 1998; KENNEDY, 1998). YAVELOW e colaboradores (1987 a), ao testarem os efeitos do bloqueio dos sítios reativos do BBI clássico em células tumorais, observaram que a molécula apenas mantinha sua atividade anticarcinogênica se o sítio reativo da quimotripsina estivesse desbloqueado. No presente trabalho, o

efeito anticarcinogênico do BTC1 foi observado na molécula nativa e no peptídeo que possui atividade de inibição para quimotripsina (PCHY), corroborando com as informações relatadas acima. Porém, outros trabalhos destacam que a ausência de inibição de quimotripsina não implica necessariamente em um baixo efeito anticarcinogênico de IPBBIs (KOBAYASHI, et al., 2004; HO et al., 2007). WANG e colaboradores (2007) descreveram IPBBIs com efeito anticarcinogênico contra células de mieloma contendo apenas atividade de inibição para a tripsina. Aparentemente, não existe uma correlação padronizada entre atividade de inibição e efeito anticarcinogênico que possa ser aplicado para todos os IPBBIs. Tais diferenças provavelmente residem em outras características intrínsecas de cada inibidor que ainda precisam ser elucidadas.

Recentemente, CHEN e colaboradores (2005) publicaram um trabalho detalhado sobre um possível mecanismo de ação anticarcinogênico do BBI clássico em vias intracelulares. Tal publicação foi um marco e um avanço nos estudos sobre a ação de IPBBIs. Os resultados do estudo mostraram que o tratamento de células de câncer de mama com o BBI clássico induziu um bloqueio na proliferação celular em decorrência da inibição do proteassomo.

O proteassomo é um complexo proteico que está localizado tanto no citoplasma quanto no núcleo celular e apresenta duas subunidades reguladoras (19 S) e uma subunidade proteolítica (20S). A subunidade proteolítica contém três sítios ativos enzimáticos já caracterizados: *chymotrypsin-like*, *trypsin-like* e *post-glutamyl peptidyl hydrolytic-like*. Proteínas com alterações em sua estrutura ou desnecessárias em alguma via celular são marcadas com polipeptídeos de ubiquitina e direcionadas ao proteassomo para degradação. O proteassomo reconhece a proteína e degrada a

mesma liberando peptídeos que podem ser usados na reciclagem de aminoácidos para síntese de proteínas ou servir como antígenos para células do sistema imune (CIECHANOVER et al., 1998; ADAMS et al., 2004).

A inibição da atividade proteolítica do proteassomo é um dos alvos mais recentes para drogas anticarcinogênicas e tem sido tema de vários artigos e revisões (ADAMS et al., 2002; ADAMS et al., 2004; NALEPA et al., 2006). Sabe-se que as vias intracelulares regulatórias determinam por quanto tempo, quando, onde e quais moléculas devem estar presentes para a continuidade do sinal. Esse controle é feito principalmente pela ativação, desativação e degradação das moléculas regulatórias. Muitos substratos do proteassomo são mediadores e reguladores de vias intracelulares que estão alteradas na carcinogênese (proliferação celular e apoptose, por exemplo) (DREXLER et al., 1997; ADAMS et al., 2004). No ciclo celular, as Cdks são reguladas pelas ciclinas. As ciclinas, assim como seus reguladores p21 e p27, são rapidamente degradados pela via ubiquitina-proteassomo assim que desempenham sua atividade nas fases do ciclo celular (GLOTZER et al., 1991; CLURMAN et al., 1996). Para a progressão da proliferação celular é necessário uma regulação exata da ativação e degradação dessas moléculas. Portanto, visando uma aplicação terapêutica, a inibição do proteassomo pode levar a um bloqueio nas fases do ciclo celular inibindo o crescimento tumoral (ADAMS et al., 2002; NALEPA et al., 2006).

Uma outra implicação da inibição do proteassomo está na apoptose. A proteína supressora de tumor P53 está presente em baixas quantidades em uma célula normal. Após o recebimento de um estímulo de estresse celular, P53 tem sua expressão e síntese aumentada e ativa várias vias intracelulares culminando, dentre outros eventos, na apoptose. Sabe-se que células tumorais super expressam moléculas reguladoras

(MDM2) que tem a atividade de ubiquitinar P53 e direcioná-la ao proteassomo para a degradação (CHENE et al., 2003). Sendo assim, a inibição do proteassomo impede a degradação de P53 permitindo sua atuação na apoptose (ADAMS et al., 2004).

Além do BBI clássico, outros inibidores de proteassomo, naturais ou sintéticos, estão sendo testados com sucesso no bloqueio da progressão do câncer e na indução de apoptose (CHANDRA et al., 1998; DOU et al., 1999; CHAUHAN et al., 2005; ADAMS et al., 2004). O mecanismo completo da inibição do proteassomo em células tumorais ainda não foi completamente elucidado, mas tal efeito já é considerado uma promessa para novos tratamentos terapêuticos contra o câncer em um futuro próximo.

É possível que o BTCI e o peptídeo PCHY atuem de maneira similar ao BBI clássico na inibição do proteassoma. Essa hipótese tem como base a semelhança estrutural e funcional entre BBI clássico e BTCI. Além disso, a diminuição da proliferação, alteração do ciclo celular e a indução de apoptose em células tratadas com BTCI e com peptídeo PCHY são semelhantes aos efeitos observados em células tratadas com moléculas inibidoras do proteassomo (CHANDRA et al., 1998; DOU et al., 1999; CHAUHAN et al., 2005; ADAMS et al., 2004).

A indução de autofagia observada em células tratadas com BTCI ou PCHY (Figuras 22 e 23) como consequência da inibição do proteassomo também é uma possível hipótese. Sabe-se que uma forma complementar de degradar o excesso de proteínas e organelas danificadas é pela ativação do mecanismo de autofagia (KONDO et al., 2005; LUZIO et al., 2007). Portanto, como a inibição do proteassomo induz o acúmulo de moléculas no citoplasma que são potencialmente tóxicas para a célula, estas podem tornar-se alvos para o mecanismo autofágico. Tal efeito foi observado em

células de câncer de próstata tratadas com um inibidor de proteassomo (YANG et al., 2006).

Sendo assim, novos estudos visando avaliar as hipóteses da internalização do BTCl e do peptídeo PCHY pela célula, da inibição da atividade proteolítica do proteassomo pelos mesmos e da ativação de autofagia precisam ser realizados. As pesquisas visando identificar a internalização do BTCl ou PCHY pela célula de câncer de mama já estão em andamento.

Além de seus efeitos anticarcinogênicos, outras características dessas moléculas corroboram para sua utilização nesse contexto. Uma das principais vias de administração de drogas anticarcinogênicas é a via intra-venosa. Nesse trabalho mostramos que o BTCl e o peptídeo PCHY não causam lise em hemáceas (Figura 25). Tais dados sugerem que esses inibidores podem ser administrados intra-venosamente sem causar prejuízo para a maioria das células sanguíneas. No entanto, os efeitos do BTCl e PCHY na corrente sanguínea ainda necessitam de uma investigação mais detalhada.

O BTCl é uma molécula que mantém sua atividade inibitória em uma temperatura de até 95°C e em uma variação de pH de 3 a 11 (SILVA et al., 2000). Essa estabilidade molecular é importante para que após a administração em um organismo, o inibidor mantenha-se ativo até sua chegada nas células alvo. Trabalhos realizados com o BBI clássico mostraram que após a administração oral, o BBI atinge o cólon intestinal na forma ativa, é absorvido como peptídeo biologicamente ativo pelas células epiteliais do local e distribuído por diferentes órgãos do organismo (WAN et al., 2000; WANG et al., 2000). A alta estabilidade dos IPBBIs também pode ser explorada para tratamentos de tumores em órgãos com pHs extremos como estômago e intestino

(FERNANDES et al., 1995; KENNEDY et al., 1996). Além disso, essa estabilidade é importante no emprego desses inibidores como medicamentos já que seria possível preparar estoques estáveis a temperatura ambiente, facilitando sua distribuição e transporte. Visando essas aplicações, estudos sobre a estabilidade do peptídeo PCHY em diferentes condições de temperatura e pH ainda precisam ser determinados.

Outra vantagem importante está na questão da solubilidade. Muitas drogas anticarcinogênicas empregadas atualmente são insolúveis em meio aquoso. Essa característica dificulta a administração e a dispersão das mesmas pelo organismo (LEUNER et al., 2000; WASSVIK et al., 2006). Opostamente, o BTCI e PCHY são solúveis em meio aquoso, fato que confere uma importante vantagem em sua utilização como medicamento. É importante destacar que, na dose de 200 μM , o BTCI tende a formar oligômeros e agregados (Figura 21), no entanto, baseado nos resultados apresentados no presente trabalho, essa reorganização de suas moléculas não implica em redução de atividade anticarcinogênica.

Sabe-se que, em solução, o BTCI apresenta a tendência de se auto-associar e formar oligômeros, no entanto, a relação entre oligomerização e atividade biológica das moléculas ainda não foi determinada. Hipóteses sugerem que os oligomêros formam motivos protéicos com potencial para atuar como moduladores da orientação e especificidade das proteases a serem inibidas (SILVA et al., 2005). Pesquisas visando estudar a formação de oligômeros de BTCI relacionada à sua atividade anticarcinogênica precisam ser realizadas.

A maioria dos IPBBIs estudados não causaram efeitos citostáticos ou citotóxicos em células normais de mama, próstata e fibroblastos (ZHANG et al., 1999; KENNEDY et al., 2002). Esse efeito é destacado como ponto positivo a favor dos mesmos em

tratamentos terapêuticos contra o câncer. No entanto, alterações de células normais tratadas com IPBBIs já foram observadas. GARCIA-GASCA e colaboradores (2002) relatam efeitos citostáticos em fibroblastos tratados com IPBBIs. ZHANG e colaboradores (1999) mostraram redução da proliferação de células normais da tireóide.

No presente trabalho, apesar de não ser tóxico para hemácias, o tratamento de fibroblastos com BTCI resultou em uma diminuição significativa da viabilidade dos mesmos (Figura 26). MOY e colaboradores (1994) descreveram que o BBI clássico inibe uma serinoprotease de 43 KDa presente em células de câncer de mama e postulou que a inibição dessa serinoprotease estava relacionada com a atividade anticarcinogênica do mesmo. Interessantemente, uma outra serinoprotease similar a anterior também foi encontrada em células de fibroblastos humanos normais. É possível, portanto, que o BTCI tenha o mesmo alvo tanto em células de câncer de mama quanto em fibroblastos, induzindo efeitos citotóxicos em ambos tipos celulares. Investigações posteriores serão direcionadas para esclarecer essa questão.

É importante ressaltar que o emprego de novas metodologias podem melhorar a especificidade do BTCI para células tumorais de interesse. A nanotecnologia tem sido amplamente utilizada para a produção de carreadores de medicamentos para o local da patologia, aumentando a quantidade de medicamento liberado no local e a especificidade do mesmo (TORCHILIN et al., 2007). Portanto, é possível que o encapsulamento do BTCI em materiais nanoparticulados, como lipossomos, ligados a moléculas sinalizadoras específicas para células tumorais proteja células normais de seus efeitos citotóxicos e citostáticos. Para avaliar essa hipótese, mais estudos serão realizados.

Diferentemente do BTCI, o peptídeo PCHY não alterou a viabilidade de fibroblastos (Figura 26). Esse resultado é surpreendente e aumenta a probabilidade da utilização desse peptídeo como um agente anticarcinogênico mais específico para células tumorais de mama. Sabe-se que outras regiões da estrutura dos IPBBIs juntamente com seus resíduos de aminoácidos contribuem, direta ou indiretamente, para sua atividade, ou seja, a topologia global da molécula interfere na atividade da mesma (COSTA et al., 2006). Dessa forma, é possível que regiões presentes apenas no BTCI estejam relacionadas com a elevada toxicidade do mesmo em fibroblastos. Mais estudos são necessários para determinar a razão da diferença de atividade em fibroblastos entre BTCI e o peptídeo PCHY.

O peptídeo PCHY, apesar de ser apenas um fragmento de BTCI, manteve a atividade de inibição específica para quimotripsina (Figura 13). Além de manter a atividade inibitória, PCHY também manteve os efeitos anticarcinogênicos de forma semelhante à sua molécula nativa sem toxicidade para células não tumorais (Figuras 25 e 26).

A continuidade dos estudos com o peptídeo PCHY no tratamento de câncer de mama pode ser considerada uma alternativa à utilização de compostos extraídos exclusivamente da natureza. O fato do peptídeo PCHY ser um composto simples e pequeno permitiu que ele fosse sintetizado em grandes quantidades em um curto período de tempo. Tal característica contribui positivamente para a redução no tempo das pesquisas, uma vez que o passo de purificação de moléculas anticarcinogênicas a partir de sementes é substituído pela síntese química, que tem como vantagens a obtenção do composto de estudo de forma rápida, econômica, segura e controlada (HAMBURGER et al., 1991; RATES et al., 2001).

Muitos estudos vêm sendo realizados visando estudar o efeito de mutações em resíduos de aminoácidos na atividade de peptídeos derivados de IPBBIs. Esses estudos buscam, por meio da engenharia de proteínas, encontrar moléculas que apresentem a menor estrutura possível capaz de manter ou intensificar os efeitos e a estabilidade da molécula molde, direcionando o processo de *screening* de novos compostos anticarcinogênicos (FENANDEZ et al., 2001; MCBRIDE et al., 2001; FEAR et al., 2007). Dessa forma o peptídeo PCHY também pode ser utilizado como molde para síntese de novos peptídeos com efeitos anticarcinogênicos e estabilidade intensificados.

O estudo ora apresentado mostra, pela primeira vez, os efeitos do inibidor BTCI e de peptídeos derivados na área de oncologia, utilizando-se como modelo células de câncer de mama, considerada uma das neoplasias malignas mais freqüentes e agressivas no Brasil e no mundo. Os resultados são promissores e apontam o BTCI e PCHY como possíveis agentes terapêuticos modulatórios alternativos ou complementares aos tratamentos convencionais como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia que, apesar de serem utilizados atualmente no tratamento desse tipo de câncer, apresentam eficiência moderada e efeitos colaterais severos.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- 1) Os tratamentos de células de câncer de mama com BTCI ou PCHY, nas concentrações de 200 e 400 μM respectivamente, por 72 horas induziram efeitos citostáticos e citotóxicos.
- 2) Os efeitos citostáticos e citotóxicos induzidos por BTCI e PCHY são característicos da apoptose e estão associados à autofagia.
- 3) BTCI e PCHY não induziram a lise de hemáceas.
- 4) BTCI reduziu a viabilidade de fibroblastos, contudo, PCHY não causou nenhuma alteração na viabilidade das mesmas.
- 5) Os peptídeos derivados do BTCI analisados mantiveram sua atividade de inibição de proteases semelhantes a molécula original. No entanto, apenas o PCHY mantave as propriedades anticarcinogênicas.
- 6) Os efeitos do BTCI e PCHY nas células avaliadas não foram causados por alterações indiretas no pH e na osmolaridade do meio de cultura, mas pela própria atuação dos inibidores.
- 7) Considerando os dados acima, BTCI e PCHY são moléculas promissoras para serem empregadas como potenciais agentes anticarcinogênicos alternativos ou complementares aos tratamentos convencionais utilizados no câncer de mama atualmente.

8. Anexo

8. ANEXO

Baseados na sequência e estrutura tridimensional do BTCl, peptídeos correspondentes aos sítios reativos de tripsina e quimotripsina foram desenhados e submetidos à síntese. Abaixo, estão relatadas informações mais detalhadas sobre eles:

PTRY (Figura 28 A):

Sequência: CTKSIPPQC

Massa Molecular : 974,17 Da

Peptídeo cíclico com uma ligação dissulfeto

PCHY (Figura 28 B):

Sequência: CTFSIPAQC

Massa Molecular : 967,14 Da

Peptídeo cíclico com uma ligação dissulfeto

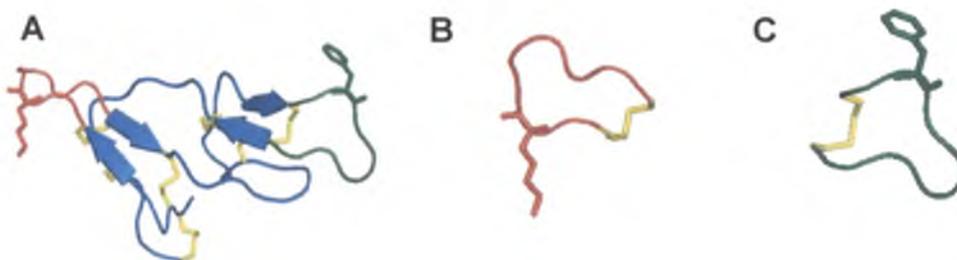


Figura 28. Estrutura de peptídeos derivados dos sítios reativos do BTCl. A) BTCl. B) Sítio reativo para tripsina (PTRY). C) Sítio reativo para quimotripsina (PCHY). Amarelo: ligação dissulfeto.

9. Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, T.; BORRESEN, A. L.; GEISLER, S.; SMITH-SORENSEN, B.; JOHNSEN, H.; VARHAUG, J. E.; AKSLEN, L. A.; LONNING, P. E. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. **Nature Medicine**, v. 2, p. 811-814, 1996.

ADAMS, J. Proteasome inhibitors as new anticancer drugs. **Current Opinion in Oncology**, v. 14, p. 628-634, 2002.

ADAMS, J. The Proteasome: a suitable antineoplastic target. **Nature Reviews: Cancer**, v. 4, p. 349-360, 2004.

AICR (American Institute for Cancer Research). **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective**. Washington: American Institute for Cancer Research, 2007. 517 p.

ANDO, S.; YASUTAKE, A.; WAKI, M.; NISHINO, N.; KATO, T.; IZUMIYA, N. Anti-chymotrypsin and anti-elastase activities of a synthetic bicyclic fragment containing a chymotrypsin-reactive site of soybean Bowman-Birk inhibitor. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 916, p. 527-531, 1987.

ARMSTRONG, W. B.; KENNEDY, A. R.; WAN, X. S.; ATIBA, J.; MCLAREN, C. E.; MEYSKENS, F. L., JR. Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 43-47, 2000 a.

ARMSTRONG, W. B.; KENNEDY, A. R.; WAN, X. S.; TAYLOR, T. H.; NGUYEN, Q. A.; JENSEN, J.; THOMPSON, W.; LAGERBERG, W.; MEYSKENS, F. L. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk Inhibitor Concentrate in a Phase I/II Chemoprevention Trial. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 12, p. 4684-4691, 2000 b.

BARBOSA, J. A.; SILVA, L. P.; TELES, R. C.; ESTEVES, G. F.; AZEVEDO, R. B.; VENTURA, M. M.; DE FREITAS, S. M. Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with β -Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 1638-1650, 2007.

BRENTANI, M. M.; COELHO, F. R. G.; KOWALSKI, L. P. **Bases da Oncologia**. 2. ed. São Paulo: Editora Marina e Tecmedd, 2003. 452 p.

BILLINGS, P. S.; BRANDON, D.L.; HABRE, J. M. Internalization of the Bowman-Birk Protease Inhibitor by Intestinal Epithelial Cells. **European Journal of Cancer**, v. 27, p. 903-908, 1991.

BILLINGS, P. C.; CAREW, J. A.; KELLER-MCGANDY, C. E.; GOLDBERG, A. L.; KENNEDY, A. R. A serine protease activity in C3H/10T1/2 cells that is inhibited by anticarcinogenic protease inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 84, p. 4801-4805, 1987.

BILLINGS, P. C.; NEWBERNE, P. M.; KENNEDY, A. R. Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 1083-1086, 1990.

BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 25, p. 113-131, 1985.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soya beans. **Biochemical Journal**, v. 87, p. 281-284, 1963.

- BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 241-252, 2000.
- BOFFETTA, P.; HASHIBE, M.; LA VECCHIA, C.; ZATONSKI, W.; REHM, J. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. **International Journal of Cancer**, v. 119, p. 884-887, 2006.
- BOWMAN, D. E. Differentiation of soybean antitryptic factors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 63, p. 547-550, 1946.
- BRAUER, A. B.; DOMINGO, G. J.; COOKE, R. M.; MATTHEWS, S. J.; LEATHERBARROW, R. J. A conserved cis peptide bond is necessary for the activity of Bowman-Birk inhibitor protein. **Biochemistry**, v. 41, p. 10608-10615, 2002.
- BUCCI, M. K.; BEVAN, A.; ROACH, M., 3RD. Advances in radiation therapy: conventional to 3D, to IMRT, to 4D, and beyond. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 117-134, 2005.
- BURNET, N. G.; BENSON, R. J.; WILLIAMS, M. V.; PEACOCK, J. H. Improving cancer outcomes through radiotherapy. **British Medical Journal**, v. 320, p. 198-199, 2000.
- BUROW, M. E.; WELDON, C. B.; TANG, Y.; NAVAR, G. L.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; HAMMOND, T. G.; CLEJAN, S.; BECKMAN, B. S. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Research**, v. 58, p. 4940-4946, 1998.
- BURSCHE, W.; ELLINGER, A.; KIENZL, H.; TOROK, L.; PANDEY, S.; SIKORSKA, M.; WALKER, R.; HERMANN, R. S. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1595-1607, 1996.
- BURTON, E.; PRADOS, M. New chemotherapy options for the treatment of malignant gliomas. **Current Opinion in Oncology**, v. 11, n. 3, p. 157-161, 1999.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.
- CELLA, D.; FALLOWFIELD, L.; BARKER, P.; CUZICK, J.; LOCKER, G.; HOWELL, A. Quality of life of postmenopausal women in the ATAC ("Arimidex", tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for early breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 100, p. 273-284, 2006.
- CHANDRA, J.; NIEMER, I.; GILBREATH, J.; KLICHE, K. O.; ANDREEFF, M.; FREIREICH, E. J.; KEATING, M.; MCCONKEY, D. J. Proteasome inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. **Blood**, v. 92, p. 4220-4229, 1998.
- CHAUHAN, D.; CATLEY, L.; LI, G.; PODAR, K.; HIDESHIMA, T.; VELANKAR, M.; MITSIADES, C.; MITSIADES, N.; YASUI, H.; LETAI, A.; OVAA, H.; BERKERS, C.; NICHOLSON, B.; CHAO, T. H.; NEUTEBOOM, S. T.; RICHARDSON, P.; PALLADINO, M. A.; ANDERSON, K. C. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. **Cancer Cell**, v. 8, p. 407-419, 2005.
- CHEN, L. B.; SUMMERHAYES, I. C.; JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BERNAL, S. D.; LAMPIDIS, T. J. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 46 Pt 1, p. 141-155, 1982.
- CHEN, Y. W.; HUANG, S. C.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1296-1306, 2005.

- CHENE, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. **Nature Reviews: Cancer**, v. 3, p. 102-109, 2003.
- CHEUNG, A. L.; DENG, W. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 2075-2090, 2008.
- CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. Dissecting p53-dependent apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 994-1002, 2006.
- CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. **The Embo Journal**, v. 17, p. 7151-7160, 1998.
- CIRMAN, T.; ORESIC, K.; MAZOVEC, G. D.; TURK, V.; REED, J. C.; MYERS, R. M.; SALVESEN, G. S.; TURK, B. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 3578-3587, 2004.
- CLARK, D. A.; DAY, R.; SEIDAH, N.; MOODY, T. W.; CUTTITTA, F.; DAVIS, T. P. Protease inhibitors suppress in vitro growth of human small cell lung cancer. **Peptides**, v. 14, p. 1021-1028, 1993.
- CLEMENTE, A.; DOMONEY, C. Biological Significance of Polymorphism in Legume Protease Inhibitors from the Bowman-Birk Family. **Current Protein and Peptide Science**, v. 7, p. 2006.
- CLEMENTE, A.; GEE, J. M.; JOHNSON, I. T.; MACKENZIE, D. A.; DOMONEY, C. Pea (*Pisum sativum* L.) protease inhibitors from the Bowman-Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8979-8986, 2005.
- CLURMAN, B. E.; SHEAFF, R. J.; THRESS, K.; GROUDINE, M.; ROBERTS, J. M. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. **Genes & Development**, v. 10, p. 1979-1990, 1996.
- COSTA, J. R.; YALIRAKI, S. N. Role of rigidity on the activity of proteinase inhibitors and their peptide mimics. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 110, p. 18981-18988, 2006.
- CUI, Q.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; MINAMI, M.; IKEJIMA, T. Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 859-864, 2007.
- DARMOUL, D.; GRATIO, V.; DEVAUD, H.; LEHY, T.; LABURTHER, M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. **American Journal of Pathology**, v. 162, p. 1503-1513, 2003.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27, p. 1-20, 1997.
- DEBATIN, K.-M.; PONCET, D.; KROEMER, G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. **Oncogene**, v. 21, p. 8786 – 8803, 2002.
- DESHPANDE, A.; SICINSKI, P.; HINDS, P. W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. **Oncogene**, v. 24, p. 2909-2915, 2005.
- DESMAZE, C.; SORIA, J. C.; FREULET-MARRIERE, M. A.; MATHIEU, N.; SABATIER, L. Telomere-driven genomic instability in cancer cells. **Cancer Letters**, v. 194, p. 173-182, 2003.

- DITTMANN, K. H.; MAYER, C.; RODEMANN, H. P. Radioprotection of normal tissue to improve radiotherapy: the effect of the Bowman Birk protease inhibitor. **Current Medicina Chemistry Anticancer Agents**, v. 3, n. 5, p. 360-363, 2003.
- DITTMANN, K.; TOULANY, M.; CLASSEN, J.; HEINRICH, V.; MILAS, L.; RODEMANN, H. P. Selective radioprotection of normal tissues by Bowman-birk proteinase inhibitor (BBI) in mice. **Strahlenther und Onkologie**, v. 181, p. 191-196, 2005.
- DOMINGO, G. J.; LEATHERBARROW, R. J.; FREEMAN, N.; PATEL, S.; WEIR, M. Synthesis of a mixture of cyclic peptides based on the Bowman-Birk reactive site loop to screen for serine protease inhibitors. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 46, p. 79-87, 1995.
- DOU, Q. P.; LI, B. Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 215-223, 1999.
- DREXLER, H. C. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 94, p. 855-860, 1997.
- DU, X.; BELOUSSOW, K.; SHEN, W. C. Bowman-Birk protease inhibitor and its palmitic acid conjugate prevent 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced transformation in cultured mouse mammary glands. **Cancer Letters**, v. 164, p. 135-141, 2001.
- EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, p. 342-348, 2001.
- FACHETTI, H. C. S., K. MIZUTA; M. M. VENTURA. Thermodynamics of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, p. 311-317, 1984.
- FASMAN, D.G. **Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**. Boston: CRC Press, 1989. 616 p.
- FEAR, G.; KOMARNYTSKY, S.; RASKIN, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 354-368, 2007.
- FERNANDES, A. O.; BANERJI, A. P. Inhibition of benzopyrene-induced forestomach tumors by field bean protease inhibitor(s). **Carcinogenesis**, v. 16, p. 1843-1846, 1995.
- FERNANDES, A. O.; BANERJI, A. P. Long-term feeding of field bean protein containing protease inhibitors suppresses virus-induced mammary tumors in mice. **Cancer Letters**, v. 116, p. 1-7, 1997.
- FERNANDEZ, J. H.; MELLO, M. O.; GALGARO, L.; TANAKA, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.; NESHICH, G. Proteinase inhibition using small Bowman-Birk-type structures. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 846-858, 2007.
- FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews: Cancer**, v. 5, p. 876-885, 2005.
- FREITAS, S. M.; L. V. DE MELLO; M. C. DA SILVA; G. VRIEND; G. NESHICH; M. M. VENTURA. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-a-chymotrypsin complex. **FEBS Letters**, v. 409, p. 121-127, 1997.
- FREITAS, S. M.; H. IKEMOTO; M. M. VENTURA. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCl). **Journal of Protein Chemistry**, v. 18, p. 307-313, 1999.

- FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 3 ed. New York: Wiley-Liss, 2000. 600 p.
- FOX, S. B.; GASPARINI, G.; HARRIS, A. L. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. **Lancet Oncology**, v. 2, p. 278-289, 2001.
- GARCIA-GASCA, T.; SALAZAR-OLIVO, L. A.; MENDIOLA-OLAYA, E.; BLANCO-LABRA, A. The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. **Toxicology in Vitro**, v. 16, p. 229-233, 2002.
- GHOBRIL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 178-194, 2005.
- GIORDANO, S. H.; COHEN, D. S.; BUZDAR, A. U.; PERKINS, G.; HORTOBAGYI, G. N. Breast carcinoma in men: a population-based study. **Cancer**, v. 101, p. 51-57, 2004.
- GLOTZER, M.; MURRAY, A. W.; KIRSCHNER, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. **Nature**, v. 349, p. 132-138, 1991.
- GOLUBKOV, V. S.; STRONGIN, A. Y. Proteolysis-driven oncogenesis. **Cell Cycle**, v. 6, p. 147-150, 2007.
- GONZALEZ-ANGULO, A. M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 608, p. 1-22, 2007.
- GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.
- GUEVEN, N.; DITTMANN, K.; MAYER, C.; RODEMANN, H. P. The radioprotective potential of the Bowman-Birk protease inhibitor is independent of its secondary structure. **Cancer Letters**, v. 125, p. 77-82, 1998.
- GUTTE, B. **Peptides Synthesis, Structures, and Applications**. San Diego: Academic Press, 1995. 511 p.
- HAIL, N., JR. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. **Apoptosis**, v. 10, p. 687-705, 2005.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HO, V. S.; NG, T. B. A Bowman-Birk trypsin inhibitor with antiproliferative activity from Hokkaido large black soybeans. **Journal of Peptide Science**, 2007, *in press*.
- HU, E.; MUELLER, E.; OLIVIERO, S.; PAPAIOANNOU, V. E.; JOHNSON, R.; SPIEGELMAN, B. M. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 13, p. 3094-3103, 1994.
- IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews: Cancer**, v. 2, p. 277-288, 2002.
- INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Ministério da Saúde. **Situação do Câncer no Brasil – 2006**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/situacao/>, acessado em 22 de janeiro de 2008.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Ministério da Saúde. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007. 94 p.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p. 139-163, 2005.

JOANITTI, G. A.; FREITAS, S. M.; SILVA, L. P. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. **Current Enzyme Inhibition**, v. 2, p. 199-217, 2006.

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

KASHER, R.; OREN, D. A.; BARDA, Y.; GILON, C. Miniaturized proteins: the backbone cyclic proteinomimetic approach. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, p. 421-429, 1999.

KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J. A.; ALI, I.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 467S-471S, 2000.

KENNEDY, A. R. Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. **Cancer Research**, v. 54, p. 1999s-2005s, 1994.

KENNEDY, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1406S-1412S, 1998 a.

KENNEDY, A. R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 78, p. 167-209, 1998 b.

KENNEDY, A. R.; BEAZER-BARCLAY, Y.; KINZLER, K. W.; NEWBERNE, P. M. Suppression of carcinogenesis in the intestines of min mice by the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. **Cancer Research**, v. 56, p. 679-682, 1996.

KENNEDY, A. R.; MANZONE, H. Effects of protease inhibitors on levels of proteolytic activity in normal and premalignant cells and tissues. **Journal of Cellular Biochemistry. Supplement**, v. 22, p. 188-194, 1995.

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

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, p. 1717-1721, 2000.

KLUCK, R. M.; ESPOSTI, M. D.; PERKINS, G.; RENKEN, C.; KUWANA, T.; BOSSY-WETZEL, E.; GOLDBERG, M.; ALLEN, T.; BARBER, M. J.; GREEN, D. R.; NEWMEYER, D. D. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, p. 809-822, 1999.

KOBAYASHI, H.; SUZUKI, M.; KANAYAMA, N.; TERAOKA, T. A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 21, p. 159-166, 2004.

KOBLINSKI, J. E.; AHRAM, M.; SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. **Clin Chim Acta**, v. 291, p. 113-135, 2000.

KONDO, Y.; KANZAWA, T.; SAWAYA, R.; KONDO, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature Reviews: Cancer**, v. 5, p. 726-734, 2005.

LASKOWSKI, M.; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 324-337, 2000.

LATHAM, P. W. Therapeutic peptides revisited. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 755-757, 1999.

LEIST, M.; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 589-598, 2001.

LESTER, J. Breast cancer in 2007: incidence, risk assessment, and risk reduction strategies. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 11, p. 619-622, 2007.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journals of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 47-60, 2000.

LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. P. Protease inhibitors: current status and future prospects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 305-341, 2000.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Research**, v. 57, p. 3071-3078, 1997.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental Cell**, v. 6, p. 463-477, 2004.

LIANG, X. H.; JACKSON, S.; SEAMAN, M.; BROWN, K.; KEMPKES, B.; HIBSHOOSH, H.; LEVINE, B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature**, v. 402, p. 672-676, 1999.

LUCKETT, S.; GARCIA, R. S.; BARKER, J. J.; KONAREV, A. V.; SHEWRY, P. R.; CLARKE, A. R.; BRADY, R. L. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. **Journal of Molecular Biology**, v. 290, p. 525-533, 1999.

LUZIO, J. P.; PRYOR, P. R.; BRIGHT, N. A. Lysosomes: fusion and function. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 622-632, 2007.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle kinases in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, p. 60-65, 2007.

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

MANZONE, H.; BILLINGS, P. C.; CUMMINGS, W. N.; FELDMAN, R.; CLARK, L. C.; ODELL, C. S.; HORAN, A. M.; ATIBA, J. O.; MEYSKENS, F. L.; KENNEDY, A. R. Levels of proteolytic activities as intermediate marker endpoints in oral carcinogenesis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 4, p. 521-527, 1995.

MARINO, G.; LOPEZ-OTIN, C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 1439-1454, 2004.

- MCBRIDE, J. D.; LEATHERBARROW, R. J. Synthetic peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor protein. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 909-917, 2001.
- MCBRIDE, J. D.; WATSON, E. M.; BRAUER, A. B.; JAULENT, A. M.; LEATHERBARROW, R. J. Peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor reactive site loop. **Biopolymers**, v. 66, p. 79-92, 2002.
- MEIJER, A. J.; CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 2445-2462, 2004.
- MESSADI, D. V.; BILLINGS, P.; SHKLAR, G.; KENNEDY, A. R. Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor. **Journal of National Cancer Institute**, v. 76, p. 447-452, 1986.
- MEYSKENS, F. L. Development of Bowman-Birk inhibitor for chemoprevention of oral head and neck cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 952, p. 116-123, 2001.
- MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, v. 33, p. 261-274, 2000.
- MORHY, L.; VENTURA, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) WaLP seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, p. 71-81, 1987.
- MORTIMER, J. E.; BOUCHER, L.; BATY, J.; KNAPP, D. L.; RYAN, E.; ROWLAND, J. H. Effect of tamoxifen on sexual functioning in patients with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, p. 1488-1492, 1999.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOTYL, T.; GAJKOWSKA, B.; ZARZYNSKA, J.; GAJEWSKA, M.; LAMPARSKA-PRZYBYSZ, M. Apoptosis and autophagy in mammary gland remodeling and breast cancer chemotherapy. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 17-32, 2006.
- MOW, B. M.; BLAJESKI, A. L.; CHANDRA, J.; KAUFMANN, S. H. Apoptosis and the response to anticancer therapy. **Current Opinion in Oncology**, v. 13, p. 453-462, 2001.
- MOY, L. Y.; BILLINGS, P. C. A proteolytic activity in a human breast cancer cell line which is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. **Cancer Letters**, v. 85, p. 205-210, 1994.
- NALEPA, G.; ROLFE, M.; HARPER, J. W. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 5, p. 596-613, 2006.
- NASCIMENTO, A.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; SEBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. **Toxicon**, v. 50, p. 1095-1104, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2004. 1100 p.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.
- NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). What do you need to know about breast cancer. **NIH Publication**, n. 05-1556, 2005.

- NISHINO, N.; AOYAGI, H.; KATO, T.; IZUMIYA, N. Synthesis and activity of nonapeptide fragments of soybean Bowman-Birk inhibitor. **Experientia**, v. 31, p. 410-412, 1975.
- NOEL, A.; HAJITOU, A.; L'HOIR, C.; MAQUOI, E.; BARAMOVA, E.; LEWALLE, J. M.; REMACLE, A.; KEBERS, F.; BROWN, P.; CALBERG-BACQ, C. M.; FOIDART, J. M. Inhibition of stromal matrix metalloproteases: effects on breast-tumor promotion by fibroblasts. **International Journal of Cancer**, v. 76, n. 2, p. 267-273, 1998.
- NOEL, A.; MAILLARD, C.; ROCKS, N.; JOST, M.; CHABOTTAUX, V.; SOUNNI, N. E.; MAQUOI, E.; CATALDO, D.; FOIDART, J. M. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. **Journal Clinical Pathology**, v. 57, n. 6, p. 577-584, 2004.
- NYBERG, P.; YLIPALOSAARI, M.; SORSA, T.; SALO, T. Trypsins and their role in carcinoma growth. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 8, p. 1219-1228, 2006.
- OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews: Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.
- PANDEY, R.; PATIL, N.; RAO, M. Proteases and Protease Inhibitors: Implications in Antitumorigenesis and Drug Development. **International Journal of Human Genetics**, v. 7, p. 67-82, 2007.
- PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 74-108, 2005.
- PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2005. 283 p.
- QI, R.-F.; SONG, Z.-W.; CHI, C.-W. Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Protease Inhibitors and Their Potential Application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, p. 283-292, 2005.
- RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **The Biochemical Journal**, v. 378, p. 705-716, 2004.
- RUBINSZTEIN, D. C.; GESTWICKI, J. E.; MURPHY, L. O.; KLIONSKY, D. J. Potential therapeutic applications of autophagy. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 6, p. 304-312, 2007.
- SAITO, T.; SATO, H.; VIRGONA, N.; HAGIWARA, H.; KASHIWAGI, K.; SUZUKI, K.; ASANO, R.; YANO, T. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. **Cancer Letters**, v. 253, p. 249-257, 2007.
- SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, p. 784-788, 2000.
- SCHMIDLIN, F.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 575-582, 2001.
- SCHNEIDER, B. P.; MILLER, K. D. Angiogenesis of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1782-1790, 2005.
- SCHWARTZ, L. M.; SMITH, S. W.; JONES, M. E.; OSBORNE, B. A. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 90, p. 980-984, 1993.

SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M. Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. **Proteins**, v. 61, p. 642-648, 2005.

SILVA, L. P.; LEITE, J. R. S. A.; BLOCH-JR, C.; FREITAS, S. M. Thermal Stability of a Black Eyed Pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor (BTCI). **Protein and Peptide Letters**, v. 7, p. 397-401, 2000.

SODERSTROM, K. O.; PARVINEN, L. M.; PARVINEN, M. Early detection of cell damage by supravital acridine orange staining. **Experientia**, v. 33, p. 265-266, 1977.

SOULE, H. D.; VAZGUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, p. 1409-1416, 1973.

SSAP Server. Disponível em: <http://protein.hbu.cn/cath/cathwww.biochem.ucl.ac.uk/cgi-bin/cath/GetSsapRasmol.html>, acessado em 31 de janeiro de 2008.

ST CLAIR, W. H.; BILLINGS, P. C.; CAREW, J. A.; KELLER-MCGANDY, C.; NEWBERNE, P.; KENNEDY, A. R. Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. **Cancer Research**, v. 50, p. 580-586, 1990.

ST. CLAIR, W. H.; ST. CLAIR, D. K.; KENNEDY, A. R. Comparison of the Bowman-Birk Protease inhibitor to WR1065 for protection against radiation-induced DNA, cellular and tissue damage. **Cancer Journal**, v. 4, n. 2, p. 278-282, 1991.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS Journal**, v. 9, p. E128-147, 2007.

VENTURA, M. M.; XAVIER-FILHO, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*).I. Purification and partial characterization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 553-566, 1966.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131-149, 2003.

VITA, C. Engineering novel proteins by transfer of active sites to natural scaffolds. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 429-434, 1997.

VON HOFE, E.; NEWBERNE, P. M.; KENNEDY, A. R. Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal neoplasms by the Bowman-Birk protease inhibitor. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 2147-2150, 1991.

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

WAN, X. S.; LU, L. J.; ANDERSON, K. E.; WARE, J. H.; KENNEDY, A. R. Urinary excretion of Bowman-Birk inhibitor in humans after soy consumption as determined by a monoclonal antibody-based immunoassay. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 741-747, 2000.

WANG, J.; SHEN, W.-C. Gastric retention and stability of lipidized Bowman-Birk protease inhibitor in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 204, p. 111-116, 2000.

WANG, Z.-H.; LI GAO, A. Y.-Y. L.; ZHANG, Z.; YUAN, J.-M.; WANG, H.-W.; ZHANG, L.; ZHUB, L. Induction of Apoptosis by Buckwheat Trypsin Inhibitor in Chronic Myeloid Leukemia K562 Cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 783-786, 2007.

- WARE, J. H.; WAN, X. S.; RUBIN, H.; SCHECHTER, N. M.; KENNEDY, A. R. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 344, p. 133-138, 1997.
- WASSVIK, C. M.; HOLMEN, A. G.; BERGSTROM, C. A.; ZAMORA, I.; ARTURSSON, P. Contribution of solid-state properties to the aqueous solubility of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 294-305, 2006.
- WEED, H. G.; MCGANDY, R. B.; KENNEDY, A. R. Protection against dimethylhydrazine-induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the Bowman-Birk protease inhibitor. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 1239-1241, 1985.
- WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2006. 850 p.
- WYMAN, C.; KANAAR, R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. **Annual Review of Genetics**, v. 40, p. 363-383, 2006.
- WHO (World Health Organization International Agency for Research on Cancer). **World Cancer Report**. Stewart BW, Kleihues P (Eds). Lyon: 2003, 352 p.
- XAVIER-FILHO, J.; M. M. VENTURA. Trypsin inhibitors in Cowpea: a review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 1, p. 239-314, 1988.
- YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysics Journal**, v. 81, p. 1475-1485, 2001.
- YANG, W.; MONROE, J.; ZHANG, Y.; GEORGE, D.; BREMER, E.; LI, H. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. **Cancer Letters**, v. 243, p. 217-227, 2006.
- YAVELOW, J.; CAGGANA, M.; BECK, K. A. Proteases occurring in the cell membrane: a possible cell receptor for the Bowman-Birk type of protease inhibitors. **Cancer Research**, v. 47, p. 1598-1601, 1987 a.
- YAVELOW, J.; COLLINS, M.; BIRK, Y.; TROLL, W.; KENNEDY, A. R. Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 82, p. 5395-5399, 1985.
- YAVELOW, J.; SCOTT, C. B.; MAYER, T. C. Fluorescent visualization of binding and internalization of the anticarcinogenic Bowman-Birk type protease inhibitors in transformed fibroblasts. **Cancer Research**, v. 47, p. 1602-1607, 1987 b.
- YOSHIDA, A.; POMMIER, Y.; UEDA, T. Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells. **International Journal of Hematology**, v. 84, p. 31-37, 2006.
- YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 47-59, 2008.
- ZHANG, L.; WAN, X. S.; DONAHUE, J. J.; WARE, J. H.; KENNEDY, A. R. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on clonogenic survival and cisplatin- or radiation-induced cytotoxicity in human breast, cervical, and head and neck cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 33, p. 165-173, 1999.