



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

CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMA, EXPRESSÃO DE CD44 E ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EM EXTRATOS INTESTINAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM 1,2 DIMETILHIDRAZINA E INIBIDORES BOWMAN-BIRK

ALESSANDRA DE PAULA CARLI

Ouro Preto
2011

C282c Carli, Alessandra de Paula.
Correlação da atividade do proteassoma, expressão de CD44 e enzimas
proteolíticas em extratos intestinais de camundongos tratados com 1,2
dimetilhidrazina e inibidores Bowman-Birk [manuscrito]/ Alessandra de Paula
Carli - 2011.

xv,70.f.: il., color.; grafs.; tabs.

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

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de
Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Bioquímica estrutural e fisiológica.

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

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

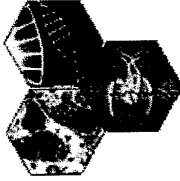
ALESSANDRA DE PAULA CARLI

CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEASSOMA, EXPRESSÃO DE CD44 E ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EM EXTRATOS INTESTINAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM 1,2 DIMETILHIDRAZINA E INIBIDORES BOWMAN-BIRK

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

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

Ouro Preto
2011



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

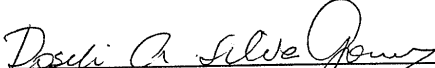



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

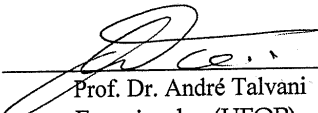
“Correlação da Atividade de Proteassoma, Expressão de CD44 e Enzimas Proteolíticas em Extratos Intestinais de Camundongos Tratados com 1,2 Dimetilhidrazina e Inibidores Bowman-Birk”

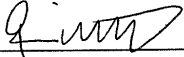
Aos 02 dias do mês de junho de 2011, às 14:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna Alessandra de Paula Carli. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por*aprovar*..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

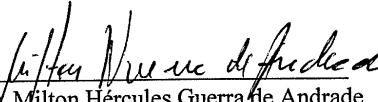
Membros da Banca Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. Roseli Aparecida da Silva Gomes
Examinadora (UFTM)


Prof.^a. Dr.^a. Maria do Carmo Peluzio
Examinadora (UFV)


Prof. Dr. André Talvani
Examinador (UFOP)


Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
Examinador (UFOP)


Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade
Presidente

DATA DA DEFESA: 02/06/2011

DEDICATÓRIA

Ao Alan Gabriel, Gabriela e Roberto
Que sofreram com a minha ausência,
Mas sempre me receberam com um sorriso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram nesse trabalho, em especial:

Agradeço ao meu marido Roberto pelo carinho, apoio incondicional e incentivo. Obrigada por compreenderem as minhas ansiedades, ausências e inseguranças;

Aos meus pais, Geraldo (in memoriam) e Inês exemplos de vida e superação;

Aos meus irmãos, Andreza de Paula Santos e Alexandre de Paula Santos por sempre estimular meu crescimento pessoal e profissional;

Ao Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade, pela orientação e amizade. Obrigada por ser você, capaz de ensinar e corrigir; você é uma pessoa muito especial;

Ao Prof. Dr. William de Castro Borges, obrigada pela co-orientação e confiança, aprendi muito com você;

À Professora Dra. Cláudia Martins Carneiro pelos conselhos valiosos e a esperança demonstrada em cada encontro;

Ao Professor Dr. Elísio Evangelhista obrigada pela ajuda e acolhimento durante o doutorado;

Ao Prof. Dr. Antônio Fonseca da Silva, Reitor do Centro Universitário de Caratinga (UNEC), obrigada por acreditar e confiar nesse projeto;

Aos professores do UNEC Maristela Barros, Shirley do Nascimento, Helena Facury e Walter Linardi, Lamara Rocha, Oneci obrigada pelo convívio diário e as palavras de coragem;

Ao Marcelo Nóbile Franco, obrigada, não apenas por me auxiliar na realização desse trabalho durante a iniciação científica, mas pela verdadeira amizade que surgiu no meio de tanto aprendizado e conquista;

Aos amigos Douglas, Andiará, Roberta, Jane (BIO), Érika (Cem Juízo), Jaqueline (Toka), Otacílio, Márcia (Nut), Eneida, Alexandre de Paula pelos deliciosos cafés e conversas, cada pessoa no seu tempo;

Ao Tiago Leal (listerine), muito obrigado pela sua disponibilidade no LBBM, pode contar sempre comigo;

Aos técnicos, José Henrique (LEP), Maria (LIMP), Zezé (Biologia Molecular) e Érika (CCA) por me socorrerem em diversos momentos difíceis e me ajudarem com a maior boa vontade;

À Estela (FEOP), exemplo de trabalho e dedicação, obrigada;

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

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

*A todos os colegas e amigos do Laboratório de Enzimologia e Proteômica: **Bruno (Ninfeto), Carol, Fabiana, Flávia, Karina, Luisa, Igor (Água mole), Marina, Priscila, Raquel, Sonaly Vinicius, Jonathan, Melina, Paula, Leandro (Tripa), Simone, Aline, Pablo (Já Morreu), Gustavo (Lula), Karine, Lorrán, Micheline, Roberta, Rose** pelo convívio e participação nesse trabalho.*

Enfim, agradeço a todos.

Este trabalho foi realizado no LABORATÓRIO DE ENZIMOLOGIA E PROTEÔMICA, LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA, LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, CENTRO DE CIÊNCIA ANIMAL – NUPEB – Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e teve o apoio da Fundação Educacional de Caratinga.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Neoplasias	1
1.1.1 Neoplasias colo-retal	4
1.2 Dimetilhidrazina (DMH), um agente indutor do câncer	6
1.3 Importâncias das proteases no desenvolvimento de neoplasias	8
1.4 Inibidores de proteases	9
1.5 Ações dos inibidores do tipo Bowman-Birk	14
1.6 O proteassoma – estrutura e funções	16
1.7 BBI e proteólise intracelular dependente de ubiquitina e proteassoma	19
1.8 CD44 e câncer	19
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Preparo do extrato enriquecido de BBI, a partir de sementes de <i>Macrotyloma axillare</i>	24
3.1.1 Preparo do extrato enriquecido de BBI, a partir de sementes de <i>Glycine max</i>	24
3.2 Dosagens de proteínas	25
3.3. Caracterização do BBI por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%	25
3.4 Ensaio enzimáticos	25
3.4.1. Atividade anti-tripsina bovina.....	25
3.4.2. Atividade anti-quimotripsina bovina.....	26
3.5. Indução de câncer com DMH no modelo experimental murino	28
3.5.1. Regime de doses para indução do câncer com DMH – Experimento I.....	27

	Página
3.6 Apresentações dos grupos experimentais de tratamento com BBI, vitaminas e DMH - Experimento III.....	28
3.7 Análises histopatológicas: fixação e processamento do material para microscopia óptica.....	29
3.8 Metodologias para avaliar a atividade peptidásica do proteassoma.....	30
3.8.1 Preparação dos homogenatos	30
3.8.2 Avaliação das atividades peptidásicas do proteassoma nos grupos experimentais	31
3.9 Preparações dos homogenatos para análise da proteína CD44	31
3.10 SDS-PAGE ensaios de <i>Western Blot</i>	31
3.11 Cromatografias de troca iônica em Q-sepharose.....	32
3.12 Produções da coluna de afinidade Sepharose-BBI e obtenção da fração ligante presente em homogenatos de segmentos intestinais	34
3.13 Atividades peptidásica da fração ligante isolada da coluna sepharose-BBI	34
3.14 Análises estatísticas.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Alterações de peso e consumo de ração ao longo do tratamento	36
4.2 Mortalidades dos camundongos durante o experimento	37
4.3 Alterações histopatológicas: observações macroscópicas e microscópicas.....	38
4.4 Avaliações da evolução do tratamento com DMH pela medida da atividade quimotripsina-simile na fração lisossomal	44
4.5 Atividades proteolítica tripsina-simile e quimotripsina-simile na fração solúvel e fração lisossomal de camundongos tratados com DMH e BBI.....	45
4.6 Perfis eletroforéticos de proteases ligadas à coluna de afinidade de BBI.....	49
4.7 Influências do BBI sobre a atividade do proteassoma	50
4.7.1 Atividade peptidásica do proteassoma em camundongos tratados com DMH	51
4.7.2 Atividade do proteassoma de animais tratados com DMH e BBI.....	52
4.7.3 Atividade de tripsina-símile do proteassoma no intestino e cólon de camundongos	52
4.7.4 Atividade de quimotripsina-simile do proteassoma no intestino e cólon de camundongos.....	53
4.8 Correlações da expressão da proteína CD44 e o tecido tumoral.....	54
5 CONCLUSÕES.....	57
6 PERSPECTIVAS	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS.....	70

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Estágios da carcinogênese. Diagrama esquemático demonstrando os quatro principais estágios do processo de carcinogênese: iniciação, promoção, progressão e manifestação. Alguns agentes causadores, possíveis genes envolvidos e alterações fenotípicas.....	2
2 Anatomia do intestino humano. No intestino grosso distinguem-se: o ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmóide, reto e ânus.....	5
3 Estrutura do Cicasina e da 1,2 dimetilhidrazina. (A) – estrutura do glicosídeo Cicasina isolado do gênero <i>Cycas</i> e (B) estrutura do carcinógeno sintético 1,2 dimetilhidrazina	7
4 Estrutura do BBI da soja, como determinado por Odani e Ikeneka (1973). A – Em tom de cinza, do lado direito, o sítio inibitório para a quimotripsina (Leu – Ser), e do lado esquerdo o sítio inibitório para a tripsina (Lys – Ser); e B – Estrutura tridimensional do BBI. O BBI isolado de soja é uma proteína de 71 aminoácidos (AA). A região carboxi-terminal da proteína está representada em roxo (AA71), e a região N-terminal representada em amarelo pelo AA1.....	10
5 Esquema representativo da interação entre tripsina (domínios identificados em magenta e verde) e o inibidor Bowman-Birk (representado em modelo de bastões e bolas).....	11
6 <i>Macrotyloma axillare</i> . À esquerda, foto da planta adulta e à direita, foto das sementes.....	12

7	Diagrama ilustrando a via de degradação protéica intracelular dependente de ubiquitina e proteassoma. Em (A) o sistema de liberação do monômero de ubiquitina para conjugação, seguido de sua ativação, transferência e conjugação ao substrato alvo. Em (B) os componentes da maquinaria celular responsável pela degradação dos alvos poliubiquitinados. Destacam-se as etapas de reconhecimento do substrato, desenovelamento ATP- dependente, abertura do canal na porção 20S e hidrólise processiva do polipeptídeo nos sítios catalíticos.	17
8	Transcritos da proteína CD44. a – pré-mRNA codificado por 20 exons. 10 éxons são regulados por splicing alternativos; b – A estrutura da proteína CD44 comparada com a isoforma variante CD44v1-10; c – O domínio amino terminal da proteína CD44 contendo o domínio de ligação do ácido hialurônico. A possível estrutura tridimensional; d – A estrutura da cadeia polipeptídica da CD44 consiste de 46 aminoácidos; e – Domínio citoplasmático carboxi-terminal com função na organização do citoesqueleto e sinalização celular.....	21
9	Acompanhamento do peso dos animais submetidos aos tratamentos.Efeito da dieta com inibidores de proteases e tratamento com DMH sobre o peso durante o tratamento. Os pontos da figura representam média dos pesos observada nos grupos experimentais.....	36
10	Mortalidade dos animais ao longo do tratamento. O gráfico representa os sete grupos de tratamento e a mortalidade dos animais durante 24 semanas do experimento.....	37
11	Glândula perianal alterada observada nos camundongos dos grupos DMH e DMHV. (A) protuberância da glândula anal na décima segunda semana de tratamento; (B) tumor na glândula anal; (C) aspecto histológico de lesões proliferativas na glândula anal; e (D) Aumento da região proliferativa.....	41

12	Fotomicrografias do cólon de animais submetidos ao tratamento com DMH. (A) Lesão macroscópica no cólon (pólipo). (B) Aspecto histológico de lesão polipomatosa; (C) inserção do pólipo na mucosa (D) maior aumento da região delimitada em C mostrando detalhes da arquitetura do pólipo. Hematoxilina e Eosina – HE. Barra = 50 µm.....	43
13	Fotomicrografias do cólon de animais controles ou submetidos ao tratamento com DMH associado ou não ao tratamento com BBIS, BBIM ou Vitaminas. (A e C) Aspecto histológico normal em animais controles; (B) infiltrado inflamatório (seta) e edema (asterisco) na camada muscular em animais do grupo DMH; (D) presença de infiltrado inflamatório na camada muscular (seta) em animais do grupo DMHV (E e F) ausência de infiltrado inflamatório em animais dos grupos DMHVS e DMHVM demonstrando aspecto histológico normal; Hematoxilina-Eosina. Barra=50 µm.....	44
14	Atividade de quimotripsina-simileluída da coluna de Sepharose-BBI. Vermelho representa a média da atividade peptidásica; + (verde) ou - (azul) desvio-padrão (s) do grupo-controle. Preto representa os animais tratados com DMH no experimento II durante 24 semanas de tratamento.....	47
15	Atividade proteolítica tripsina e quimotripsina-simile na fração solúvel recuperada da coluna de Sepharose-BBI. (DMHS) – tratamento DMH + BBI de soja; (DMHS+VIT) – tratamento DMH + BBI de soja + Vitaminas A, C e E; (DMHM) – tratamento com DMH + BBI de <i>M. axillare</i> ; (DMHM +VIT) – tratamento com DMH + BBI de <i>M. axillare</i> + vitaminas A, C e E.....	49
16	Atividade proteolítica tripsina e quimotripsina-simile na fração lisossomalrecuperada da coluna de Sepharose-BBI. (DMHS) – tratamento DMH + BBI de soja; (DMHS+VIT) – tratamento DMH + BBI de soja + Vitaminas A, C e E; (DMHM) – tratamento com DMH + BBI de <i>M. axillare</i> ; (DMHM +VIT) – tratamento com DMH + BBI de <i>M. axillare</i> + vitaminas A, C e E.....	50
17	Perfil eletroforético da protease. Gel de gelatina. PMM – Padrão de peso molecular. Linha 1 – SDS-PAGE 15% acrilamida, impregnada de 0,1% de gelatina, as bandas negativas demonstram a atividade proteolítica da fração ligada à coluna de afinidade com o BBI. Linha 2 – SDS-PAGE 15% fração ligada à coluna de BBI.....	51

18	Atividade quimotripsina-simile e tripsina-simile do proteassoma na presença e ausência do inibidor MG132 em camundongos <i>swiss</i> . Os ensaios foram realizados em seis animais em cada grupo de tratamento, controle – animais que não receberam dieta contendo BBI, S controle – animais que receberam a dieta contendo BBI de soja e M controle – animais que receberam a dieta contendo BBI de <i>Macrotylomaaxillare</i>	50
19	Atividade quimotripsina-simile e tripsina-simile do proteassoma na presença dos substratos fluorêscente em cólon de camundongos <i>swiss</i> . Os ensaios foram realizados em quatro animais em cada grupo de tratamento, controle – cólon de animais que não receberam o carcinógeno DMH durante as 24 semanas de tratamento e DMH – cólon de animais que receberam o carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina.....	51
20	Atividade tripsina-simile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato cólon e intestino em camundongos <i>swiss</i> . Os ensaios foram realizados em seis animais em cada grupo de tratamento.....	52
21	Atividade quimotripsina-simile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato cólon e intestino em camundongos <i>swiss</i> . Os ensaios foram realizados em seis animais em cada grupo de tratamento onde CI controle intestino e CC controle cólon.....	53
22	Padrão da expressão da proteína CD44. (a) Gel 1 e (c) densitometria do gel 1, não houve diferenças significativas no conteúdo protéico nos grupos; (b) A membrana1; e (d) densitometria da membrana 1 entre os grupos-controle e DMH e DMHV.....	55
23	Padrão da expressão da proteína CD44. (a) Gel 1' e (c) densitometria do gel 1', não houve diferenças significativas no conteúdo protéico nos grupos; (b) a membrana1; e (d) densitometria da membrana entre os grupos-controle e DMH e DMHS e DMHM.....	55
24	Padrão da expressão da proteína CD44. (a) Gel 2 e (c) densitometria do gel 2, não ocorreu diferenças significativas nos grupos; (b) a membrana 2; e (d) densitometria da membrana 2 entre os grupos-controle e MC e SC.....	56

25	Padrão da expressão da proteína CD44. (A) Gel 3 e (C) densitometria do gel 3, não ocorreu diferenças significativas nos grupos; (B) a membrana 3; e (D) densitometria da membrana 3 entre os grupos-controle e MC e SC.	56
1A	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 15% SDS-PAGE do BBI utilizado para preparar a ração e a coluna de afinidade de BBI.Linha 1 = Padrão de Massa Molecular (PMM); Linha 2 = BBIS; e Linha 3 = BBIM gel...	70

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Sumário do experimento III.....	29
2 Consumo de ração pelos animais durante o experimento.....	37
3 Percentual de camundongos que apresentaram alterações macroscópicas e microscópicas no cólon e intestino nos diferentes grupos experimentais	40
4 Percentual de camundongos que apresentaram alterações macroscópicas e microscópicas na glândula anal pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AQ	Atividade antiqumotripsina
AT	Atividade antitripsina
BBI	Inibidores do tipo <i>Bowman-Birk</i>
BBIM	Inibidor <i>Bowman-Birk</i> obtido da semente de <i>Macrotyloma axillare</i>
BBIS	Inibidor <i>Bowman-Birk</i> obtido da semente de <i>Glycine max</i>
BCA	Ácido bicinchoninico
cm	Centímetros
ConA	Lectina da concanavalina A
DCM	Diclorometano
DIPC	Diisopilcarbodimida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
ES-MS	<i>Electrospray</i> – espectro de massa
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
Glu-C	EndoproteaseGlu-C
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (CLAE)
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
Ki	Constante de inibição
Lys-C	Endoproteinase Lys-C
mA	miliAmpére
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
mg	miligramas
MM	Massa Molecular
Ms	Milisegundo

pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
V	Volts
UV	Ultravioleta
W	Watts

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

RESUMO

Os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) são moléculas protéicas contendo dois domínios inibitórios distintos para enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina. O interesse por essa classe de inibidores decorre de estudos que demonstraram o efeito protetor dos BBI no câncer induzido quimicamente. No presente trabalho avaliou-se o efeito dos BBI isolados de *Macrotyloma axillare* e *Glycine max* na prevenção de neoplasias colo-retal induzidas por injeções intraperitoneais de dimetilhidrazina (DMH) durante 12 semanas. Os grupos de camundongos controle e testes (tratados com DMH) receberam uma dieta contendo BBI, na dose de 0,1% (p/p) associada (DMHV) ou não às vitaminas A, C e E, durante 24 semanas. Camundongos tratados com DMH apresentaram alterações histopatológicas compatíveis com a formação de pólipos neoplásicos. Em concordância com a histologia, a análise do marcador tumoral CD44, por *Western blotting*, revelou aumento significativo de expressão nos animais tratados com DMH e DMHV. Os extratos protéicos provenientes desses tecidos apresentaram aumento significativo de atividade proteolítica dependente de proteassoma, em ensaios peptidásicos para as atividades tripsina e quimotripsina símiles. Por outro lado, para o grupo de animais tratados com DMH e BBI observou-se atividade proteassomal comparável àquela dos animais do grupo controle. O tratamento de animais com BBI isoladamente promoveu a redução da atividade proteolítica dependente de proteassoma quando comparada àquela de animais alimentados com dieta normal. Além disso, retenção de enzimas com atividades proteolíticas tripsina e quimotripsina-símile, provenientes das frações lisossomal e solúvel, foi observada utilizando uma coluna de afinidade sepharose-BBI. As atividades dessas enzimas também se mostraram significativamente aumentadas no grupo de animais tratados com DMH. Esses resultados demonstraram que inibições de atividades proteolíticas distintas podem contribuir para o mecanismo protetor dos BBI. Coletivamente os resultados permitiram concluir que o tratamento com BBI foi capaz de prevenir a formação de pólipos intestinais, impedir o estabelecimento de eventos inflamatórios no intestino delgado, cólon e glândula anal, e manter em níveis normais o marcador clássico tumoral CD44.

ABSTRACT

The Bowman-Birk inhibitors (BBI) are protein molecules containing two distinct inhibitory domains for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. The interest for this class of inhibitors is based on studies which demonstrated a protective effect promoted by BBI, particularly for chemically-induced cancers. In the present work, we evaluated the effects of BBI isolated from *Macrotyloma axillare* and *Glycine max* in the prevention of colon cancers induced by intraperitoneal injections of dimethylhydrazine (DMH) during 12 weeks. Control and DMH-treated animals were fed a diet containing BBI at a dose of 0.1% (p/p) associated (DMHV) or not with the vitamins A, C and E, during 24 weeks. DMH-treated animals exhibited histopathological alterations compatible with the formation of neoplastic polyps. In agreement with the histological examinations, analysis of the tumor marker CD44, by *Western blotting*, revealed a significant increase in its expression for the DMH-treated group. Protein extracts from these tissues also contained increased proteasome-dependent proteolytic activity as judged by peptidase assays for the trypsin and chymotrypsin-like activities. In contrast, for DMH + BBI-treated animals proteasomal activity was comparable to that observed for the control group. In fact, animals given BBI alone, as a diet supplement, exhibited decreased proteasomal activity when compared to that from animals fed a normal diet. In addition, by using a sepharose-BBI affinity column, it was observed retention of enzymes displaying trypsin and chymotrypsin-like activities obtained from the lysosomal and soluble fractions. These proteolytic activities were also shown to be increased for DMH-treated animals. These results suggest that the inhibition of distinct proteolytic activities could account for the protective mechanisms produced by BBI. Collectively our analyses allowed us to conclude that BBI treatment was able to prevent intestine polyp formation, decrease any associated inflammatory processes and keep at basal levels the classic tumor marker CD44.

1 INTRODUÇÃO

O avanço da industrialização gera de forma progressiva o aumento da frequência e exposição a novos agentes químicos, potencialmente nocivos como indutores tumorais. Substâncias ativas na prevenção do câncer estão presentes em algumas plantas (KHAODHIAR, 2006). Nesse sentido, a soja tem sido considerada uma importante fonte alimentar contendo substâncias quimiopreventivas (LOSSO, 2008). Muitos estudos apontam o inibidor Bowman-Birk (BBI) presente na soja como o principal componente dotado de atividade anticarcinogênica (KENNEDY *et al.*, 2008). Por outro lado, o proteassoma tem sido considerado importante alvo de drogas antitumorais (HANNA, 2007) e possui na sua estrutura enzimas com atividades tripsina e quimotripsina símile que podem ser inibidas por essa classe de inibidores (CHEN *et al.*, 2005). O Bortezomib é um inibidor de proteassoma altamente efetivo em algumas neoplasias hematológicas sendo esse composto aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de mielomas múltiplos (CAVO, 2006). A inibição da atividade do proteassoma pode influenciar em várias funções celulares. Nesse sentido, a utilização de inibidores do proteassoma mostrou múltiplos efeitos celulares, além de promover efeitos antiinflamatórios, anticarcinogênicos, antiproliferativos e apoptóticos em células com desenvolvimento anormal, como as cancerosas (CHEN *et al.*, 2005). Esse trabalho demonstrou que o BBI inibe especificamente a atividade quimotripsina-símile proteassomal *in vitro* em células MCF7 isoladas de câncer de mama provocando acúmulo de substratos ubiquitinados e uma diminuição nos níveis de ciclinas regulatórias do ciclo celular. O presente estudo refere-se a uma avaliação da ação protetora de BBIs isolados de *Macrotyloma axillare* e *Glicyne max* sobre a prevenção do desenvolvimento de neoplasias induzidas quimicamente com o carcinógeno 1,2 dimetilhidrazina e um acompanhamento da indução de neoplasias pela medida da atividade do proteassoma, expressão de CD44 e atividade proteolítica associada a coluna de afinidade de BBI. Nesse sentido, uma abordagem multidisciplinar foi empregada objetivando o entendimento das alterações teciduais, celulares e moleculares relacionadas ao câncer, as quais poderiam estar suprimidas pelos efeitos anticarcinogênicos dos BBIs. Assim, será apresentada a seguir, uma revisão sobre os temas relacionados ao trabalho.

1.1 Neoplasias

O processo neoplásico pode ser definido como o crescimento autônomo de tecidos que escapam das restrições normais da proliferação celular e exibem graus variáveis de fidelidade aos seus precursores. As neoplasias são divididas em duas grandes categorias: benignas e malignas. Podem ser causadas por fatores externos (substâncias químicas, irradiação e vírus) ou internos (hormônios, condições imunológicas e mutações genéticas) (Figura 1), que pode agir em conjunto ou em seqüência para iniciar ou promover a carcinogênese (CROCE, 2008).

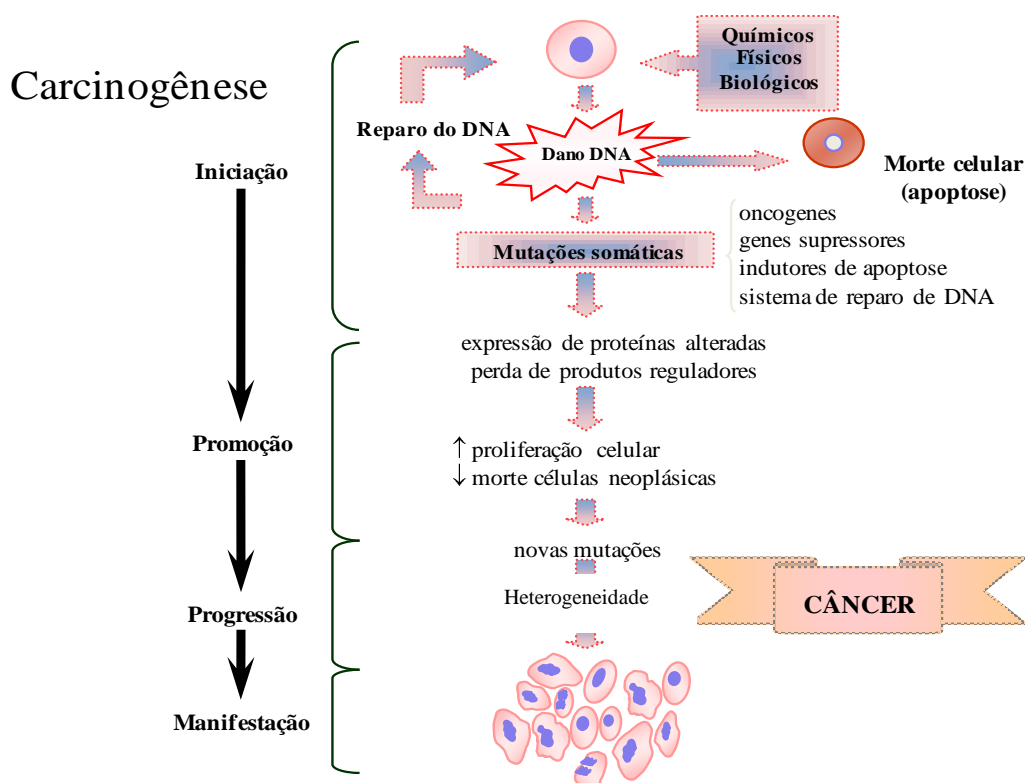


Figura 1. Estágios da carcinogênese. Diagrama esquemático demonstrando os quatro principais estágios do processo de carcinogênese: iniciação, promoção, progressão e manifestação. Alguns agentes causadores, possíveis genes envolvidos estão ilustrados, fonte: Croce, 2008.

A carcinogênese é um processo complexo, multifásico e dependente de fenômenos genéticos e epigenéticos que culminam com o surgimento de células que adquirem a capacidade de invadir os tecidos e provocar metástase em órgãos distantes. (INCA, 2009). O primeiro estágio da carcinogênese, conhecido como etapa de iniciação, caracteriza-se por alteração permanente e irreversível do DNA celular resultante de alterações genéticas induzidas por carcinógenos. A célula iniciada pode transformar-se em maligna, se receber ou não estímulos promotores de malignidade (INCA, 2009). A etapa subsequente à iniciação é representada pela promoção. O estágio de promoção tumoral é caracterizado pela expansão

clonal de células iniciadas pela ação do agente promotor definindo as alterações de expressão de genes geralmente relacionados à proliferação, apoptose e inflamação. Diferentemente da iniciação, a promoção é reversível desde que retirado o agente promotor. Durante a progressão do tumor, além da irreversibilidade, as células pré-neoplásicas se tornam invasivas e mais expansivas devido à progressiva instabilidade genômica (IRBY *et al.*, 2004).

Os danos genéticos responsáveis pelo surgimento do câncer ocorrem preferencialmente em genes que regulam a proliferação celular, como os protooncogenes e genes supressores de tumor (CROCE, 2008). Em longo prazo essas alterações genéticas resultam na promoção tumoral como aumento da proliferação, inibição da apoptose, maior capacidade de invasão e metástase, entre outras (HOSHIMOTO *et al.*, 2009).

Protooncogenes são genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do crescimento, diferenciação e morte celular (JORDE *et al.*, 2000). Quando os protooncogenes encontram-se mutados ou com sua expressão descontrolada por algum mecanismo de rearranjo gênico, diz-se que estão ativados e passam a receber o nome de oncogene. Uma vez ativados, o oncogene hiper-expressam seus produtos protéicos (BORRELLO *et al.*, 2008) e ativam ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), conduzindo a célula a um processo de proliferação desregulada, propiciando o desenvolvimento de uma neoplasia (LU *et al.*, 2005).

Os genes supressores de tumor codificam proteínas que atuam no controle da divisão celular, prevenindo uma proliferação celular excessiva. A perda da função desses genes e, ou, as inibições de seus produtos por oncoproteínas mutados, comuns no processo carcinogênico, levam à desregulação da proliferação celular, com conseqüente crescimento celular descontrolado, desencadeando displasias e ou, tumores malignos (BRENNAN; SYRJANEN, 2003).

O gene supressor de tumor mais bem estudado em tumores humanos é o TP53. Esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear (p53) que tem papel ativo no bloqueio do ciclo celular e indução da expressão de genes de reparo de DNA lesado (FINLAY *et al.*, 1989). Quando ocorre a inativação do gene TP53, observa-se uma maior susceptibilidade ao aparecimento do câncer em virtude da extinção de um dos mecanismos de defesa celular (PIETSCH *et al.*, 2008).

Além da perda de controle da proliferação, as células tumorais induzem a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais pré-existentes. Esse processo, chamado de angiogênese, constitui um importante mecanismo para o crescimento tumoral, sendo

responsável pela efusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos das células neoplásicas em proliferação (WEINBERG, 2008; TANDLE *et al.*, 2004).

A angiogênese é um evento essencial para o desenvolvimento normal dos tecidos e homeostase do organismo (FOLKMAN, 2007). Em condições fisiológicas, esse processo é mantido por um equilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos, que garantem que a neovascularização ocorra de maneira ordenada, regulada e autolimitada. (MAEDA *et al.*, 1995; HASINA; LINGEN, 2001).

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

A metástase é um processo complexo, constituído por várias etapas, que resulta da interação entre as células cancerosas e o microambiente onde as células se encontram. Para desenvolver uma metástase, as células tumorais devem ser capazes de perder as interações intercelulares, migrar pela matriz extracelular, invadir vasos sanguíneos e linfáticos (invasão), sobreviver na circulação, invadir e proliferar no parênquima do órgão-alvo (KOBILINSKI *et al.*, 2000; NYBERG *et al.*, 2006).

1.1.1 Neoplasias colo-retal

O intestino grosso é um dos locais mais frequentes de neoplasias primárias no corpo humano, que podem ter caráter benigno, os adenomas, ou maligno, os carcinomas (adenocarcinomas). As estimativas da incidência e mortalidade por câncer para o ano de 2010 apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos, dos quais são esperados 236.240 novos casos no sexo masculino e 253.030 no feminino (INCA, 2010).

As estatísticas apontam o câncer colorretal como o quinto tumor maligno mais freqüente entre homens e quarto entre as mulheres. A maior incidência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento já aumentam a partir dos 40 anos. Vários fatores podem estar envolvidos, como, o envelhecimento da população, sedentarismo e hábitos alimentares pouco saudáveis (INCA, 2010).

Do ponto de vista anatômico, o intestino grosso é formado pelos segmentos cólon e o reto. O cólon possui quatro regiões: o cólon ascendente, o cólon transverso, cólon

descendente e o cólon sigmóide. Do sigmóide o intestino continua pelo reto que termina no canal anal (HAMILL *et al.*;2002) (Figura 2).

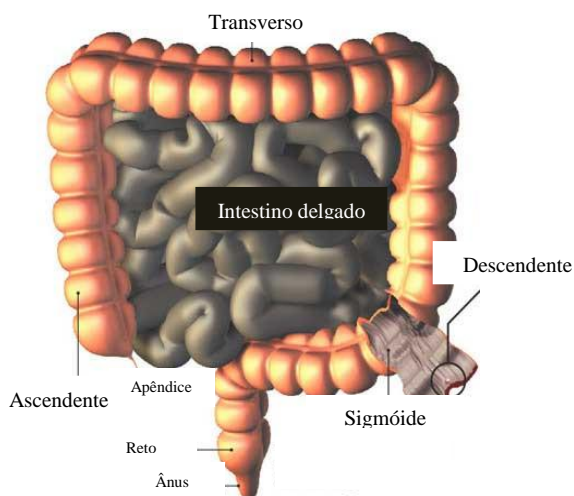


Figura 2. Anatomia do intestino humano. No intestino grosso distinguem-se: o ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmóide, reto e ânus Fonte: Hamill *et al.*, (2002).

O cólon e o reto têm a função de absorver a água que é ingerida com os alimentos e transformar a massa da substância ingerida e não aproveitada pelo corpo em fezes para que seja eliminada. Essas duas porções do tubo digestivo são muito semelhantes no que diz respeito a sua função. Assim, os tumores que acometem estas regiões são chamados, normalmente, de câncer colorretais e tratados como uma única doença (KUMAR *et al.*, 2011).

Assim, o câncer colo-retal pode se iniciar tanto no cólon quanto no reto. A maioria destes tumores se inicia em pólipos que são formações não cancerosas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Outros tipos de tumores que podem aparecer no cólon ou reto são os tumores carcinóides, tumores do estroma gastrointestinal e linfomas. Esses tipos de câncer podem atingir a mucosa através da parede muscular do intestino. O tumor pode sofrer metástase e ir para linfonodos mais próximos através da invasão de vasos linfáticos, e para o fígado, através da veia porta. Pode ainda apresentar metástases em outros órgãos, principalmente para pulmões, ossos e cérebro (JUCÁ *et al.*, 2008).

De modo geral, poucos promotores de tumores atuam puramente por meio de mecanismos citotóxicos ou mitogênicos. Em vez disso, a grande maioria parece dirigir a expansão clonal por meio de mecanismo envolvendo a inflamação. Assim, a inflamação é considerada um importante evento associado à carcinogênese (BANNER *et al.*, 1993).

Nesse sentido, o processo inflamatório pode induzir aumento da proliferação celular e a produção de radicais livres mutagênicos. Os danos oxidativos mutagênicos ao DNA,

produzidos por uma inflamação aguda, podem ser importantes na iniciação de neoplasias do cólon tanto em ratos como em humanos (BANNER *et al.*, 2000). Bactérias fecais podem gerar grande fluxo de espécies reativas de oxigênio na superfície do lúmen intestinal e células inflamatórias nas proximidades do cólon podem produzir espécies reativas de nitrogênio (GALAMB *et al.*, 2008).

As células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos. O componente inflamatório do desenvolvimento neoplásico pode incluir uma diversa população de leucócitos, dentre esses, os macrófagos e os linfócitos T são predominantes neste ambiente. Todos são capazes de produzirem uma variedade de mediadores como citocinas, espécies reativas de oxigênio, cisteína e serina proteases, metaloproteases (MMP), agentes de proliferação de membranas e mediadores de morte celular como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas e interferons que podem exercer efeito paradoxal no desenvolvimento do câncer. (LU *et al.*, 2006).

1.2 Dimetilhidrazina (DMH), um agente indutor do câncer

O aumento da concentração de agentes químicos no ambiente com o avanço crescente da industrialização, tem resultado em doenças crônicas decorrentes do contato diário com essas substâncias. Os carcinógenos químicos são divididos em duas grandes categorias: carcinógeno diretos, que são agentes alquilantes e possuem atividade eletrofílica intrínseca e carcinógenos indiretos, que precisam sofrer modificações químicas no organismo antes de se tornarem eletrofílicos e ativos, sendo denominados protocarcinógenos.

Os carcinógenos químicos diretos e indiretos agem sobre o DNA e causam mutações, estimulam a proliferação celular e induzem tumores numa variedade de órgãos, dependendo da dose, via e frequência de administração, e sexo do indivíduo. O principal mecanismo de ação dos carcinógenos químicos é a formação de compostos covalentes com o DNA, que aumentam a probabilidade de ocorrerem erros durante a replicação e podem inibir a atividade das enzimas reparadoras (ROSEMBERG *et al.*, 2009).

A 1,2 dimetilhidrazina (DMH) é um carcinógeno químico indireto. Sua ligação ao oxigênio ligado ao carbono seis da guanina (O6-MeG) no DNA altera a ligação de hidrogênio, leva a um erro de leitura pela DNA polimerase e resulta em transição G:A (LEVI *et al.*, 2009). A DMH pertence a uma classe de compostos amplamente utilizada em trabalhos experimentais com indução de câncer. Na década de 60, o glicosídeo *Cycasin* encontrado nos gêneros *Xamia* e *Cycas* foram bastante utilizados em experimentos para indução de neoplasias

de cólon, em ratos (Figura 3). Os análogos sintéticos 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e Azoximetano (AOM) começaram a serem utilizados por LORIEN *et al.* (2004).

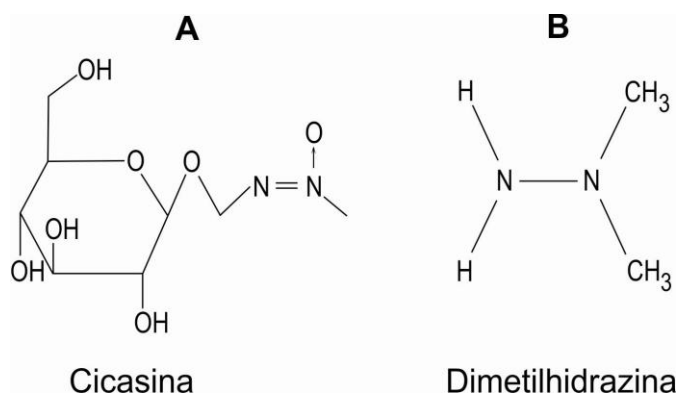


Figura 3. Estrutura do Cicasina e da 1,2 dimetilhidrazina. A – estrutura do glicosídeo cicasina isolado do gênero *Cycas* e B estrutura do carcinógeno sintético 1,2 dimetilhidrazina derivado do primeiro.

A DMH tem sido o carcinógeno mais utilizado em estudos experimentais em razão de sua estabilidade química e alta taxa de obtenção de tumores após um determinado período de latência e da via de administração. O DMH induz carcinomas com semelhança morfológica e histológica aos tumores de ocorrência natural em humanos (LARANJEIRA *et al.*, 1998).

O agente cancerígeno DMH tem a propriedade de induzir neoplasias em ratos, camundongos, cobaias (LORIEN *et al.*, 2004). DMH induz a proliferação de tumores no cólon em grande número, principalmente no sigmóide e reto, podendo, ocasionalmente, ocorrer ao redor da junção duodeno-jejunal. A preferência pelo cólon é explicada pela proliferação celular mais intensa, induzida pelo DMH, nesse local, principalmente no segmento distal do que no restante do intestino. Associa-se também deficiência nos mecanismos de reparo do DNA nesse segmento (BERRIEL *et al.*, 2005).

Os resultados dos trabalhos que utilizaram o DMH como agente carcinogênico demonstraram que camundongos tratados com DMH apresentaram células em apoptose no cólon, onde foi observado aumento na proliferação celular e mutação do DNA (KURAGUCHI *et al.*, 2001; LORIEN *et al.*, 2004). Estudos histológicos de tumores induzidos por DMH mostram um alto grau de inflamação (KUMAR *et al.*, 2002).

1.3 Importância das proteases no desenvolvimento de neoplasias

Uma das primeiras associações entre as proteases e o câncer foi realizada por Fischer *et al.*, (1946), quando propôs que a atividade proteolítica poderia ser responsável pela degradação da matriz extracelular de células neoplásicas e subsequente invasão do tumor em tecidos normais. Até então se acreditava que as enzimas proteolíticas contribuíssem para o desenvolvimento do câncer apenas nas etapas de metástase, no entanto, sabe-se que as proteases participam de todas as etapas de progressão do tumor (LAUFS *et al.*, 2006; NYBERG *et al.*, 2006).

As proteases são fundamentais para a manutenção da homeostasia celular. A correlação entre os aspectos histológicos e a expressão das diferentes proteínas demonstrou que um grande número de moléculas proteicas desempenha funções específicas como, crescimento de vasos endoteliais, alterações do citoesqueleto, digestão de membranas, adesão celular (NYBERG, 2006).

Várias barreiras opõem-se ao movimento de invasão tecidual, como as membranas basais, a matriz estromal e a junção entre as células. Acredita-se que um mecanismo comum para o rompimento destas barreiras seja a atuação de enzimas proteolíticas. Os tipos de proteases envolvidas dependem do tipo de tecido e das características encontradas na matriz. Considerando os diferentes mecanismos catalíticos de hidrólise do sítio ativo, as endopeptidases podem ser divididas em cinco subclasses de proteases: metaloproteases—MMP, serino, cisteíno, aspártico e treonino-proteases. Estas podem apresentar distribuição alterada, aumento na expressão e/ou atividade e, portanto, podem participar na remodelação da matriz, facilitando a invasão tumoral (KOBILINSKI *et al.*, 2000; PUENTE *et al.*, 2003).

Aproximadamente um terço de todas as proteases conhecidas são serino-proteases (MORRIS *et al.*, 2005). Essas enzimas possuem massas moleculares que variam de 19 à 110 kDa e apresentam atividade ótima em pH alcalino e temperatura fisiológica. Entre as principais enzimas pertencentes a esse grupo estão a tripsina e quimotripsina. Apesar de apresentarem alta similaridade estrutural, a tripsina e a quimotripsina reconhecem substratos diferentes. A tripsina hidrolisa, de maneira específica, as ligações peptídicas no lado carboxila dos aminoácidos arginina e lisina, enquanto a quimotripsina catalisa a hidrólise de ligações após resíduos de leucina, fenilalanina e tirosina (LOSSO *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstram que a tripsina é uma enzima amplamente expressa em células e tecidos tumorais. Essa protease, além de contribuir para a degradação de matriz

extracelular, ativa metaloproteases e modula o comportamento celular através da ativação de vários receptores e de fatores de crescimento (KENNEDY *et al.*, 2002).

A homeostase celular requer a existência de um equilíbrio entre as proteases e seus inibidores endógenos e o desequilíbrio desse controle poderão gerar inflamação, artrites, angiogênese patológica, crescimento tumoral (KENNEDY *et al.*, 2008).

1.4 Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases do tipo *Bowman-Birk*, comumente chamados de BBI, são inibidores protéicos citoplasmáticos de serino-proteases. Os BBIs foram isolados pela primeira vez em sementes de soja (*Glycine max*) por Bowman, em 1946 e caracterizados por Birk em 1961, sendo posteriormente identificados em outras leguminosas (NORIOKA *et al.*, 1982; NORIOKA, 1983); e gramíneas (ODANI *et al.*, 1986). Os BBIs derivaram de um ancestral dotado de uma única cabeça de inibição e por duplicações e mutações genéticas surgiu então uma estrutura com dupla cabeça de inibição para proteases (TANG *et al.*, 1993).

Os BBI são proteínas de baixa massa molecular, aproximadamente 8 KDa, apresentam estrutura em cadeia única (Figura 4A), rica em resíduos de cisteína que lhes confere uma estrutura rígida e bastante conservada nas diferentes espécies do reino vegetal (MORHY,1987), do qual são exclusivas.

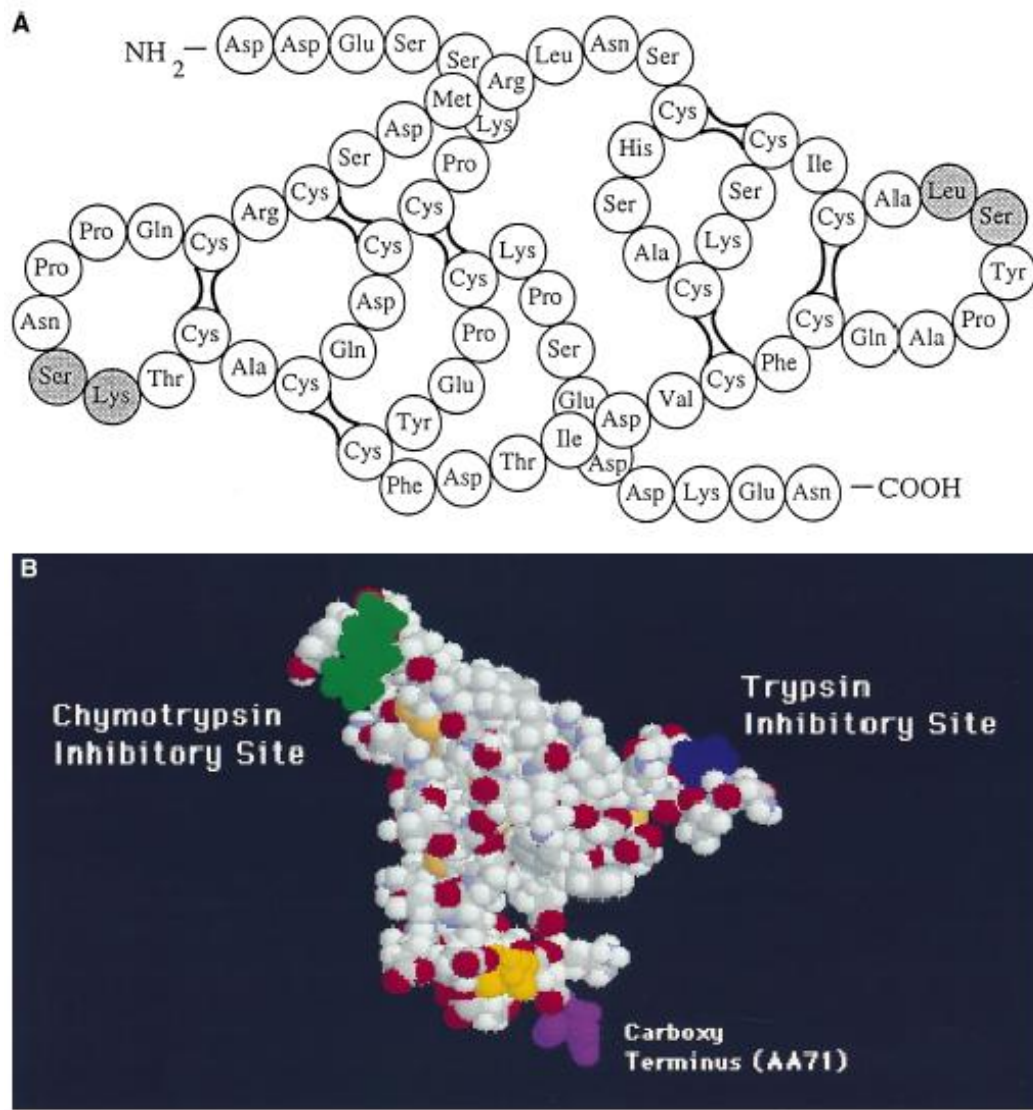


Figura 4. Estrutura do BBI da soja, como determinado por Odani e Ikeneka (1973). A –Em tom de cinza, do lado direito, o sítio inibitório para a quimotripsina (Leu – Ser), e do lado esquerdo o sítio inibitório para a tripsina (Lys – Ser); e B–Estrutura tridimensional do BBI. O BBI isolado de soja é uma proteína de 71 aminoácidos (AA). A região carboxi-terminal da proteína está representada em roxo (AA71), e a região N-terminal representada em amarelo pelo AA1. O sítio inibitório para a quimotripsina, AA43-44 está representado em verde e o sítio inibitório para tripsina está mostrado em azul, AA16-17 Fonte: Kennedy *et al.*, (1998).

As principais enzimas inibidas por BBI são tripsina e quimotripsina, uma vez que sua estrutura possui dois *loops* ou duas “cabeças de inibição”, sendo uma para a tripsina e outra para a quimotripsina, cada cabeça consistindo de nove resíduos de aminoácidos (Figura 4B) (PRAKASH *et al.*, 1996). Estudos cristalográficos mostraram que a estrutura tridimensional dessa proteína é estabilizada principalmente pelas pontes dissulfeto, com uma pequena contribuição do núcleo hidrofóbico da molécula (CHEN *et al.*, 1992).

As posições dos aminoácidos, pertencentes ao substrato ou inibidor protéico, são definidas de acordo com o aminoácido que interage com o resíduo catalítico da enzima

proteolítica. Esse aminoácido, em se tratando de substrato, sofrerá um ataque nucleofílico sobre a carbonila da ligação peptídica, a qual será hidrolisada. O aminoácido presente no substrato ou no inibidor que interage com o resíduo catalítico nesta posição é denominado P_1 e aqueles que se situam à montante da carbonila envolvida na hidrólise são numerados gradativamente, P_2 , P_3 , e assim sucessivamente; os aminoácidos que se situam à jusante daquele são numerados P_1' , P_2' e assim por diante. Os sítios de interação da enzima em posições correspondentes aos aminoácidos do peptídeo que se acomodam no sítio catalítico são denominados S_1 , S_2 , S_1' , S_2' (Figura 5).

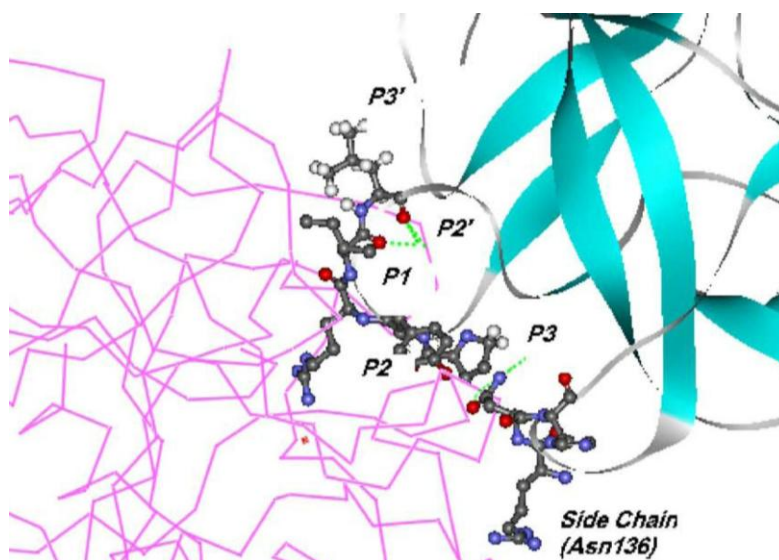


Figura 5. Esquema representativo da interação entre tripsina (domínios identificados em magenta e verde) e o inibidor Bowman-Birk (representado em modelo de bastões e bolas). Fonte: Satana (2004).

As análises das seqüências das alças de inibição revelem que essas sejam extremamente conservadas (ODANI, 1973). Os BBIs apresentam variações pontuais muito importantes que podem modificar suas especificidades; as posições mais relevantes são P_1 e P_2' . Variações na posição P_2' resultam em diferenças na estabilidade do inibidor quanto à sua velocidade de hidrólise (CLEMENTEA E DOMONEY, 2006). O aminoácido serina em P_1' é altamente conservado, mas em peptídeos sintéticos a substituição por alanina apresentou uma boa tolerância, demonstrando que este resíduo não é essencial para a integridade da alça reativa (PRAKASH *et al.*, 1997).

Estudos de substituições na posição P_2' de peptídeos sintéticos promoveram alterações significativas na constante de inibição, variando entre 9 nM e 1 mM, confirmando a importância desta posição na interação com a enzima. A substituição na posição P_2' pelo aminoácido isoleucina resulta em baixo valor para a constante de inibição, da mesma maneira

as substituições por aminoácidos com cadeia lateral alifática melhoram bastante a potência inibitória. Aminoácidos carregados positivamente como arginina e lisina são bem tolerados e produzem constantes relativamente baixas; já as substituições com cadeias laterais dotadas de cargas negativas resultam em inibidores pobres. A substituição pelo resíduo de glutamato, por exemplo, praticamente não acarreta atividade inibitória, e o inibidor apresenta constante de inibição superior a 1mM (GARIANI *et al.*, 1999).

Variações na posição P₂' dos inibidores para tripsina são muito importantes, visto que S₂' constitui o sítio alostérico da tripsina (ANDRADE ;MARES-Guia, 1990). Dessa forma, substituições promovidas nesta posição influenciaram nos valores das constantes de inibição.

Recentemente, o Laboratório de Enzimologia e Proteômica da UFOP refinou a técnica de purificação do BBI a partir de uma leguminosa utilizada como forrageira para o gado, a *Macrotyloma axillare*, a partir de resultados inicialmente publicados por JOUBERT, (1979). *M. axillare* constitui uma planta rasteira, perene, constituída de caules pilosos e com folhas verdes brilhantes trifoliadas. Suas flores são amarelas esverdeadas e as vagens pilosas são ligeiramente reclinadas, contendo de sete a oito sementes por vagem. A *M. axillare* é uma planta de origem africana, com distribuição abundante na África Tropical, podendo ser cultivada em países de clima tropical e subtropical (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – PLANTS DATABASE, 2003) (Figura 6).

Em nível estrutural, molecular e de outras propriedades químicas e físicas, os BBI(s) purificados da semente da *Macrotyloma axillare*, denominado DE-3 e DE-4, se assemelha bastante ao BBI da soja, apresentando uma seqüência de aminoácidos com elevado grau de homologia, incluindo os 14 resíduos de cisteína conservados (JOUBERT *et al.*, 1979). Entretanto, esses dois inibidores apresentam diferenças fundamentais nas suas estruturas que determinam diferentes padrões de inibições sobre a tripsina e quimotripsina, sendo válido considerar que essas diferenças poderão ser ainda maiores em enzimas associadas à sua atividade antitumoral. O BBI de soja apresenta nas cabeças de inibição de tripsina os resíduos LYS 26 SER 27 enquanto que para a cabeça de inibição de quimotripsina os resíduos envolvidos são ASN 52 e LEU 53, SER 54 e TYR 55. A seqüência equivalente para o inibidor de *Macrotyloma axillare* é LYS 26, SER 27 e ILE 28 para a cabeça de inibição de tripsina e PHE 53, SER 54 e ILE 55 para a cabeça de inibição de quimotripsina na isoforma DE-3 e LEU 53, SER 54 e GLY 55 na isoforma DE-4. Como pode ser observado o inibidor de *Macrotyloma axillare* apresenta uma ILE na posição P₂' da interação com a posição que privilegia esse inibidor do ponto de vista de interação com a tripsina tornando-o mais ativo que o inibidor da soja (SANTOS, 2006).



Figura 6. *Macrotyloma axillare*. À esquerda, foto da planta adulta e à direita, foto das sementes. Fonte: *Food And Agriculture Organization Of The United Nations* (2003).

A interação do BBI com a tripsina ou com a quimotripsina é capaz de inibir fortemente a atividade dessas serina-proteases. A conformação do *loop* do sítio reativo do BBI é complementar ao sítio ativo da proteína a ser inibida, permitindo uma ligação firme do inibidor à protease (CHEN *et al.*, 2005). Essa ligação do tipo reversível ocorre com elevada afinidade, semelhante à afinidade pelos substratos protéicos. Estudos mostraram que as duas enzimas (tripsina e quimotripsina) podem ser simultaneamente inibidas pelo BBI em sua forma monomérica. Acredita-se que ocorra uma pequena mudança conformacional no inibidor com o objetivo de acomodar as duas enzimas, havendo então um comportamento cooperativo nessas ligações (PRAKASH *et al.*, 1997).

Nesse contexto, os inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk surgiram como um dos mais potentes agentes quimiopreventivos do câncer, sendo capaz de prevenir ou suprimir os processos carcinogênicos em vários modelos *in vitro* e *in vivo* (YAVELOW *et al.*, 1985; KENNEDY *et al.*, 1998).

A capacidade do BBI em prevenir a carcinogênese tem sido estudada, tanto em sua forma purificada quanto na forma de extrato protéico de soja enriquecido de BBI, chamado de BBI concentrado (BBIC) (KENNEDY, 1998). A habilidade do BBI em suprimir os processos carcinogênicos parece estar relacionada à presença do sítio reativo do inibidor de quimotripsina.

Armstrong *et al.*, (2000) realizaram estudos com pacientes portadores de leucoplasia oral e observaram que os pacientes que receberam um tratamento com BBIC de soja

toleraram bem a administração oral do concentrado; não apresentando reações alérgicas, sinais de toxicidade nem alterações significativas de exames laboratoriais.

Kennedy *et al.* (1993) mostraram que BBI administrado pela via oral alcança a corrente sanguínea em concentrações significativas com a subsequente distribuição pelo trato gastrointestinal (BILLINGS *et al.*, 1992). Experimentos realizados por Kennedy *et al.* (1998) mostraram que aproximadamente metade do BBI administrado via oral pode ser absorvida e distribuída pelo corpo, isso graças à habilidade do BBI em resistir à ação de enzimas digestivas e chegar com mais de 90% na forma intacta ao cólon, 50% é excretado de forma inalterada nas fezes, enquanto o restante atravessa as células do epitélio intestinal ou cruza o lúmen intestinal via mecanismo paracelular (BILLINGS *et al.*, 1992). Com 3 horas da administração oral de BBI-I125 em camundongos, o mesmo é largamente distribuído e encontrado na forma nativa na maioria dos órgãos internos (YAVELOW *et al.*, 1983; BILLINGS *et al.*, 1992). Quando BBI é administrado via oral, a meia-vida sérica é de 10 horas tanto em ratos como em hamsters (KENNEDY *et al.*, 1996).

Os vários estudos de distribuição com BBI I125-soja, deixam claro que 40 a 50% do BBI marcado são excretados nas fezes e parte da radioatividade também é detectada na urina. Após 3 horas o inibidor está amplamente distribuído pelo organismo alcançando 2 a 5% do BBI administrado na circulação e 1 a 2% de maneira homogênea em órgãos como: esôfago, fígado, pulmão, rins e estômago. A radioatividade medida nestes órgãos corresponde a moléculas de massa molecular equivalente ao padrão do inibidor marcado determinada em filtração molecular (BILLINGS *et al.*, 1992).

1.5 Ações dos inibidores do tipo Bowman-Birk

O interesse por essa classe de inibidores de proteases está fundamentado nas descobertas de que o BBI pode atuar como agente preventivo do câncer em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. Os BBIs também mostraram atividade antiinflamatória pela inibição de proteases envolvidas no processo inflamatório (KENNEDY, *et al.*, 1998). Em estudos com animais utilizando BBIC de soja na dieta foi observada redução dos níveis de agregados linfóides ou infiltrados linfocíticos, os quais foram diretamente correlacionados com o declínio na formação de tumores (St. CLAIR *et al.*, 1990; HARRISON *et al.*, 1994).

Os inibidores de proteases são capazes de prevenir o influxo de leucócitos polimorfonucleares (PNM) a focos inflamatórios, bem como a liberação de espécies reativas

de oxigênio por estas células, contribuindo com a atividade antiinflamatória (GARCIA-GASCA *et al.* 2002).

A maioria dos dados sobre atividade anticarcinogênica de inibidores de proteases vem de estudos da habilidade desses agentes em suprimir a transformação induzida por carcinógenos *in vitro* (KENNEDY *et al.*, 1993). Inibidores de proteases com atividade anticarcinogênica podem suprimir a transformação decorrente de radiação quando aplicados em culturas irradiadas até mesmo após duas semanas da exposição à irradiação (KENNEDY *et al.*, 1996). Células expostas a carcinógenos químicos e radiação, apresentam eventos de iniciação tumoral ligados à expressão anormal de vários genes. Tais alterações de perfil transcricional aumentam a probabilidade de essa mesma célula passar para o estágio subsequente de transformação (KENNEDY *et al.* 1996). Os inibidores de proteases anticarcinogênicos estão envolvidos em diversas hipóteses que explicam o mecanismo de prevenção de transformações carcinógenos induzidos. Acredita-se que o BBI possa reverter o estágio inicial da carcinogênese, tão bem como afetar o estágio promocional. Assim, a ativação de protooncogenes, *c-fos* e *c-myc*, como passo inicial dessas transformações em sistemas *in vitro* e *in vivo* tem sua expressão reduzida por BBI e outros inibidores com mesmo efeito (CHANG *et al.*, 1990).

Vários protooncogenes e oncogenes foram investigados frente à atividade antitumoral de inibidores de proteases dentre eles *c-fos*, *c-myc* (St. CLAIR *et al.*, 1990). O BBI não alterou os níveis normais de *c-myc* em células normais, mas foi capaz de retornar aos níveis normais a expressão de *c-myc* em células de expressão elevada. Em sistemas nos quais o cólon foi irradiado, porém quando exposto ao BBI, os níveis de *c-myc* RNA eram comparáveis a sistemas não irradiados, assim como em sistemas expostos apenas ao BBI (TROLL *et al.*, 1989). A expressão do oncogenec-*myc* pode ser controlada em células nas quais o processo de transformação ainda não ocorreu, dessa forma parece que os inibidores de protease anti-carcinogênicos agem em um ou mais pontos centrais para o processo de transformação maligna (KENNEDY *et al.*, 1998).

1.6 O proteassoma – estrutura e funções

O proteassoma é um complexo multiprotéico responsável pela degradação de proteínas intracelulares, um processo que requer energia metabólica (TANAKA, 2009). Como regulador de uma variedade de substratos protéicos, o proteassoma participa de importantes funções celulares e, desta forma, tem seu papel bem estabelecido em vários processos relacionados à carcinogênese, como proliferação, apoptose, angiogênese e metástase (VOUTSADAKIS *et al.*, 2008).

O sistema ubiquitina-proteassoma é essencial para a manutenção da maquinaria celular eucariota desempenhando um papel central na proteólise de proteínas intracelulares (ADAMS *et al.*, 2003) e sendo conhecido por atuar na regulação de vários processos fisiológicos, e considerado um alvo emergente para a terapia do câncer (AMERIK & HOCHSTRASSER, 2004). A inibição da atividade proteassômica influencia em muitos processos celulares, resultando em ação antiinflamatória, anticarcinogênica, antiproliferativa e apoptótica em células tumorais (ANBANANDAM *et al.*, 2008).

A estrutura do proteassoma 20S é constituída de 28 subunidades protéicas agrupadas em duas famílias distintas: alfa e beta, sendo as subunidades alfas estruturais e as subunidades betas catalíticas (Figura 7). Estudos utilizando microscopia eletrônica demonstraram uma estrutura cilíndrica, contendo um canal central, constituída de quatro anéis superpostos, sendo os dois anéis nas extremidades constituídos de sete subunidades alfa, e os dois anéis internos, constituídos de sete subunidades beta, formando uma estrutura do tipo $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. As subunidades do tipo beta contêm resíduos de treonina cataliticamente ativos na posição N-terminal, portanto, o proteassoma é classificado como uma treonina-protease (TANAKA, 2009). A subunidade β_1 possui atividade do tipo caspase-símile e cliva preferencialmente após resíduos ácidos; a β_2 é do tipo tripsina-símile cliva preferencialmente após resíduos básicos, enquanto que a β_5 é do tipo quimotripsina-símile clivando preferencialmente após resíduos hidrofóbicos. As contribuições relativas dos diferentes sítios ativos do proteassoma na hidrólise de proteínas, em células de mamíferos, são de interesse particular para a avaliação do impacto fisiológico e terapêutico de inibidores (KISSELEV *et al.*, 2006). O proteassoma 20S pode se associar a outros complexos como o PA700 (*Proteasome Activator MW700*, também conhecido como 19S ou Complexo Regulatório), PA28 (também conhecido como 11S ou REG) e ao PA200. Quando o complexo 20S se associa ao complexo 19S, ocorre à formação do proteassoma 26S, que está envolvido na degradação de proteínas poliubiquitinadas. O PA700 é constituído por diferentes subunidades, com massa molecular

variando entre 10-110 kDa. Essas subunidades são classificadas em dois subgrupos: subunidades com funções ATPásicas e não ATPásicas. O papel das ATPases está relacionado ao desenovelamento das proteínas e ao fornecimento da energia necessária para a degradação seletiva. As subunidades não ATPásicas, como RPN10 e RPN11, apresentam funções de reconhecimento de proteínas poliubiquitinadas e ação desubiquitinadora, respectivamente (HANNA, FINLEY, 2007). Em contraste com o PA700, PA28 e PA200 não reconhecem proteínas ubiquitinadas e não necessitam de ATP. Diversos resultados experimentais demonstraram que o proteassoma 20S, ligado ao ativador PA28 desempenha papel importante na resposta imune, mais especificamente no processo de apresentação de antígenos (RECHSTEINER; HILL, 2005). O PA200, o ativador de proteassoma mais recentemente descoberto, acredita-se estar envolvido com o reparo do DNA (USTRELL *et al.*, 2002).

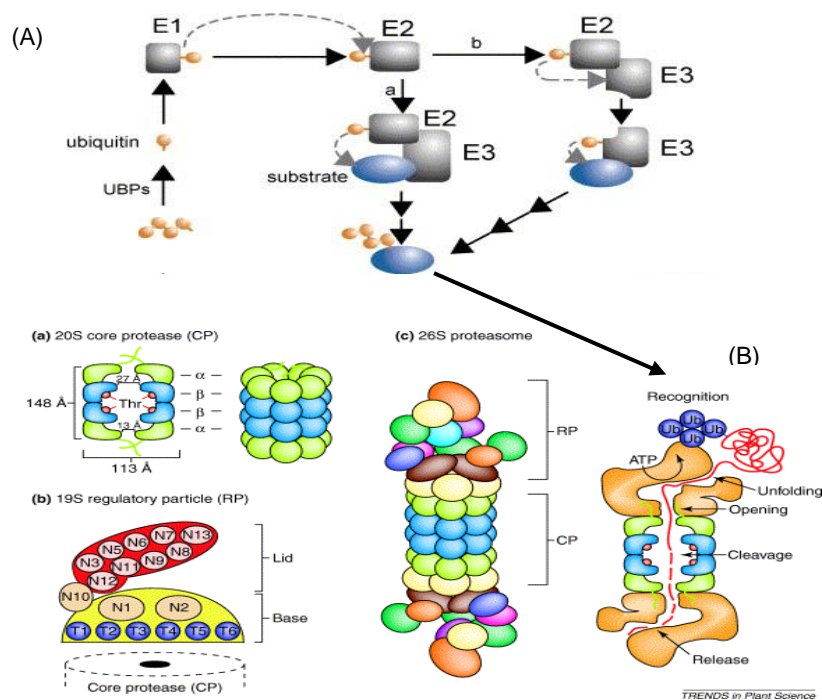


Figura 7. Diagrama ilustrando a via de degradação proteica intracelular dependente de ubiquitina e proteassoma. Em (A) o sistema de liberação do monômero de ubiquitina para conjugação, seguido de sua ativação, transferência e conjugação ao substrato alvo. Em (B) os componentes da maquinaria celular responsável pela degradação dos alvos poliubiquitinados. Destacam-se as etapas de reconhecimento do substrato, desenovelamento ATP-dependente. Abertura do canal na porção 20S e hidrólise processiva do polipeptídeo nos sítios catalíticos. (A) Fonte: adaptado de Wolf e Hilt (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal; e (B) Fonte: adaptado de Vierstra, R. D. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins.

A ubiquitina é um polipeptídeo constituído por 76 aminoácidos, presente em todas as células eucarióticas, sendo encontrada no citosol, núcleo e superfície celular. Em eucariontes superiores, um dos papéis da ubiquitina é marcar proteínas que serão degradadas via

proteassoma. Esse processo requer a participação seqüencial de três a quatro famílias de enzimas: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2), enzima ligante de ubiquitina (E3) e enzimas E4. Essas últimas auxiliam algumas enzimas E3 durante a polimerização da cadeia de ubiquitina (WILKINSON, 1995; ELSASSER; FINLEY, 2005).

Para a ubiquitinação de uma proteína alvo, inicialmente ocorre formação de uma ligação tio-éster entre a carboxila terminal da ubiquitina e o grupo sulfidril da enzima ativadora de ubiquitina, sendo uma reação dependente de ATP. Posteriormente, a ubiquitina ativada é transferida para uma sulfidril da enzima conjugadora de ubiquitina e, finalmente, a enzima ligante de ubiquitina catalisa a transferência da ubiquitina de E2 para a proteína alvo. Após sucessivos ciclos, as proteínas alvo vão se tornar poliubiquitinadas, sendo então os alvos para degradação pelo proteassoma 26S (WILKINSON, 1995). É importante ressaltar que o processo de ubiquitinação é reversível, e a remoção da molécula de ubiquitina ligada ao substrato alvo se dá através de enzimas desubiquitinadoras (AMERIK & HOCHSTRASSER, 2004).

Alguns inibidores sintéticos permeáveis à membrana foram desenvolvidos para inibirem a atividade do proteassoma: MG-132 (N-carbobenzoxi-leucinil-leucinil-leucinal), PSI (N-carbobenzoxi-L-gama-t-butil-L-glutamil-L-alanil-L-leucina) e o inibidor peptídil do tipo não-aldeído Z-L3VS (carboxibenzil-leucil-leucil-leucina vinil sulfona), estes são freqüentemente utilizados em testes *in vitro* e *in vivo* e demonstram especificidade moderada ao proteassoma. Recentemente dois metabólitos de origem microbiana: a lactacistina e a epoximicina, demonstraram agir seletivamente sobre o proteassoma e, portanto são considerados até o momento os inibidores mais específicos do complexo proteassoma 20S (TANAKA, 2009).

Bortezomib, também conhecido como *Velcade* ou PS-341, é um inibidor de proteassoma altamente efetivo em algumas neoplasias hematológicas. Este composto foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de mieloma múltiplo e está sendo utilizado clinicamente em mais de 85 países (CAVO *et al.*, 2006). Além disso, estudos pré-clínicos demonstraram que a inibição do proteassoma potencializou a atividade de outros agentes terapêuticos, e particularmente, a combinação da inibição do proteassoma com novas terapias alvo é um campo emergente na oncologia (TANAKA, 2009). A inibição da atividade do proteassoma pode influenciar várias funções celulares. Nesse sentido, a utilização de inibidores do proteassoma mostrou múltiplos efeitos celulares, além de promover efeitos antiinflamatórios, anticarcinogênicos, antiproliferativos e apoptóticos em células com desenvolvimento anormal, como as cancerosas (CHEN *et al.*, 2005).

1.7 BBI e proteólise intracelular dependente de ubiquitina e proteassoma

O BBI tem sido um importante alvo nas pesquisas envolvendo inibidores de proteases por possuir atividade inibitória anti-quimotripsina, a qual está diretamente envolvida com a atividade anti-carcinogênica (KENNEDY *et al.*, 2008). Neste sentido, faz-se necessário destacar que os inibidores de protease anti-carcinogênicos mais potentes são aqueles com a habilidade em inibir a quimotripsina ou proteases quimotripsina-símile (KENNEDY, 1998). O BBI possui propriedades antiinflamatórias e rádioprotetoras, sendo também capaz de inibir a produção de radicais livres e a transformação induzida por carcinógenos. Apesar de o BBI possuir um amplo espectro de atividade câncer-protetor, o exato mecanismo pelo qual esse inibidor exerce seus efeitos anti-carcinogênicos permanece por ser elucidado (BILLINGS *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 1990; KENNEDY, 2002).

Um estudo realizado por Chen *et al.*(2005) utilizaram o BBI isolado do grão de soja afim de verificar se a atividade inibitória anti-quimotripsina do BBI poderia inibir também a atividade quimotripsina-símile do proteassoma 26S. Os autores demonstraram que o BBI inibiu especificamente a atividade quimotripsina-símile proteassomal *in vitro* em células MCF7 isoladas de câncer de mama. Foi ainda demonstrado que tal inibição está associada ao acúmulo de substratos ubiquitinados e com uma diminuição nos níveis de ciclinas regulatórias do ciclo celular. Os autores sugerem que a inibição da atividade do proteassoma pelo BBI poderia contribuir para seu efeito preventivo no câncer.

Evidências adicionais da interação BBI e proteassoma foram descritas por (SAITO *et al.*, 2007), os quais demonstraram que o BBI também suprimiu a atividade quimotripsina-símile do proteassoma em células de osteosarcoma. De maneira específica o BBI inibiu a degradação da conexina 43 pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Sugere-se que o efeito anti-proliferativo observado seja devido à atuação da conexina como proteína supressora de tumor através da manutenção do controle homeostático em organismos multicelulares via junções GAP. Estudo realizado por Suzuki *et al.*, (2005) reportaram que o BBI suprimiu o desenvolvimento de sarcoma ovariano em células M5076 e induziu elevação da proteína conexina 43 no mesmo sarcoma.

1.8 CD44 e câncer

As moléculas de adesão constituem um grupo heterogêneo de proteínas transmembrana que regulam as interações adesivas célula-célula e célula-matriz (HYNES, 2009). Alterações na expressão e na função das moléculas de adesão de variadas classes e funções relacionam-se com o desenvolvimento tumoral, a diferenciação das células neoplásicas, a invasão e metástase (CHRISTOFORI, 2003).

A alterações na adesão celular tem importante papel no desenvolvimento das neoplasias. Acredita-se também que a invasão tumoral e a disseminação metastática estejam relacionadas com moléculas envolvidas na adesão celular (HYNES, 2002). No câncer colorretal, a transformação adenoma-carcinoma ocorre em consequência às alterações genéticas que incluem algumas moléculas já identificadas, entre elas as proteínas caderina-E, cateninas, DCC e CD44 (MIKAMI *et al.*, 2004).

A adesão celular não deve ser entendida como um fenômeno estático com efeito limitado à função de “cimento” intercelular. Frequentemente, as moléculas envolvidas nesse processo, além da função de ligação, permitem a transmissão de sinais reguladores e a troca de informações entre células. Assim, a interação, mediada por essas moléculas permite às células organizarem-se em grupos e formarem estruturas complexas, bem como participar da organização e da reconstrução tissular (YU *et al.*, 2002).

O CD44 é um gene que codifica uma ampla variedade de proteínas de superfície celular, através do processamento alternativo de seus éxons (Figura 8). Este gene é composto por 20 éxons, dos quais 10 são chamados éxons constantes, sendo expressos juntos em todos os tipos celulares sob a forma padrão (CD44s). Os éxons remanescentes podem sofrer processamento alternativo e serem incorporados aos éxons padrões, gerando um número variado de isoformas protéicas (CD44v). Estruturalmente, a proteína CD44 contém 363 aminoácidos e consiste de três regiões: um domínio citoplasmático C-terminal de 72 resíduos de aminoácidos, um domínio transmembrana de 21 resíduos de aminoácidos e um domínio extracelular de 270 aminoácidos que se liga ao ácido hialurônico, sendo um dos principais receptores celulares de superfície (GOODISON *et al.*, 1998).

O CD44 representa uma família de isoformas que, em certos tumores, têm expressão elevada nos tecidos. Os pesquisadores avaliaram o CD44 solúvel na saliva como um potencial marcador molecular para câncer de cabeça e pescoço e concluíram que o exame pode ser efetivo para detectar esse tipo de câncer em todos os estágios (FRANZMANN *et al.*, 2005).

Interações entre as células mesenquimais e epiteliais são consideradas fundamentais para o mecanismo de oncogênese, sendo apontado que o processo de invasão tumoral e metástase requerem alterações complexas nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, as quais refletem numa hiper-expressão de proteínas, entre elas o CD44 (HANLEY *et al.*, 2006). Estudos demonstram que a expressão do CD44 e de suas isoformas é alterada em diferentes tipos de neoplasias, sendo observado um padrão de expressão com notável diversidade molecular (BANKFALV *et al.*, 2002).

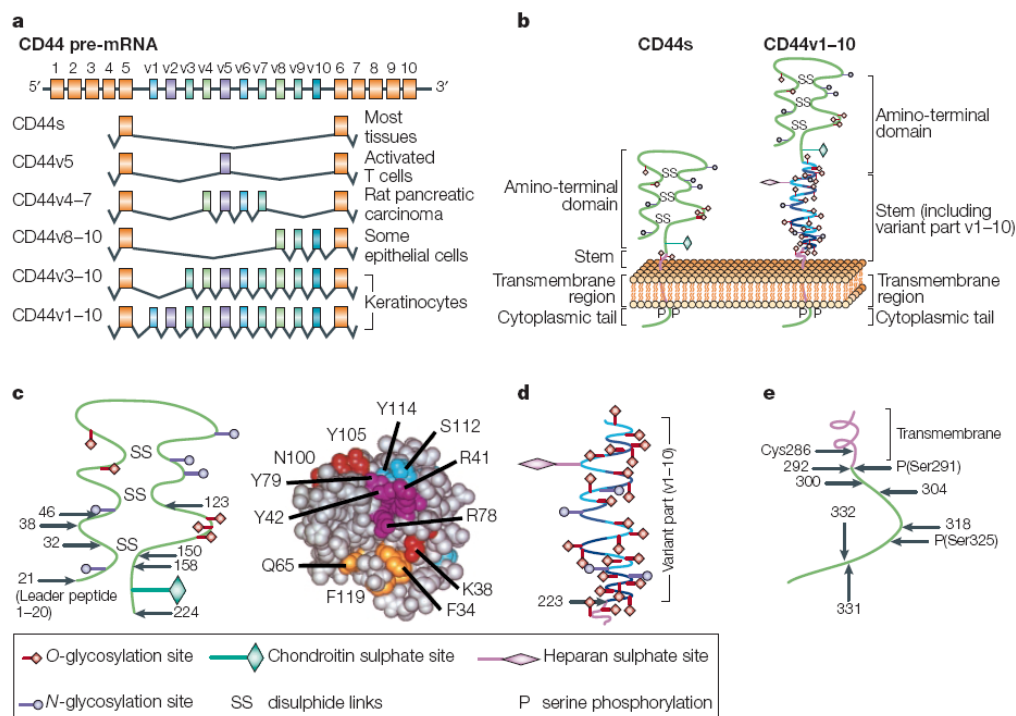


Figura 8. Transcritos da proteína CD44. **a** – pré-mRNA codificado por 20 exons. 10 éxons são regulados por splicing alternativo; **b** – A estrutura da proteína CD44 comparada com a isoforma variante CD44v1-10; **c** – O domínio amino terminal da proteína CD44 contendo o domínio de ligação do ácido hialurônico. A possível estrutura tridimensional; **d** – A estrutura da cadeia polipeptídica da CD44 consiste de 46 aminoácidos; **e** – Domínio citoplasmático carboxi-terminal com função na organização do citoesqueleto e sinalização celular. Fonte: Ponta *et al.*, (2003)

Tem sido observada uma associação entre níveis de expressão do CD44v e a presença de metástase (CUSACK *et al.*, 2006). As isoformas do CD44 são expressas nas células malignas, especialmente o CD44v, uma vez que estas podem atuar como moléculas de adesão promotoras do crescimento e invasão tumoral (GONG *et al.*, 2005).

A expressão do CD44 foi avaliada em 38 casos de carcinoma epidermóide oral, sendo 19 de língua e 19 de boca e em dez amostras de mucosa oral normal, com o objetivo de estabelecer uma correlação entre o estágio tumoral e a expressão da referida molécula. Os

resultados demonstraram uma correlação entre a expressão do CD44v e o grau de diferenciação tumoral, sugerindo que o CD44v venha a ser um indicador do potencial metastático em carcinomas epidermóides orais (KITAHORI *et al.*, 1998).

Um estudo com o objetivo de definir se a expressão de CD44 (s,v3,v4,v5,v6,v7,v9), E-caderina e B-catenina correlacionava-se ou não com o prognóstico do carcinoma epidermóide oral avaliaram 93 tipos de carcinomas. A expressão das moléculas de adesão estudadas foi comparada com os seguintes fatores clínico-patológicos: tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, grau de diferenciação, análise do tecido invasivo e recorrência. Foi observada perda da expressão da E-caderina e B-catenina e forte acúmulo de CD44 (s, v3,v4 e v7) no tecido invasivo. Nos casos de metástase linfonodal e recorrência do tumor, houve além da perda de expressão da E-caderina, aumento significativo do CD44 v9, permanecendo inalterada a expressão do CD44 v5 e v6. Estes indicaram que, durante a carcinogênese e a progressão do tumor há expressão alterada de moléculas de adesão, podendo indicar que estas moléculas apresentem um valor prognóstico do carcinoma. (BANKFALVI *et al.*, 2002).

Dessa forma, acredita-se que esse marcador de células possa ser usado no acompanhamento terapêutico avaliando a progressão do tumor. Estes estudos justificam a utilização de CD44 como um marcador celular do tecido tumoral (HYNES, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o tratamento preventivo com inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) de *M. axillare* e *G. max* em neoplasias induzidas com 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e correlacionar esse efeito aos seguintes marcadores teciduais e moleculares:

- 1 Análise histológica do cólon e glândula anal;
- 2 Atividade de proteases lisossomais e solúveis após cromatografia de afinidade em sepharose-BBI;
- 3 Atividade peptidásica do proteassoma;
- 4 Expressão da proteína CD44.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação da dieta com inibidores de proteases e vitaminas A, C e E na prevenção de neoplasias.

Comparar alterações nas atividades tripsina-símile e quimotripsina-símile, recuperadas pela coluna de BBI, na fração solúvel e lisossomal.

Detectar em gel proteases obtidas da coluna de afinidade com BBI proveniente das lesões tumorais.

Avaliar o efeito do tratamento com DMH e BBI sobre a atividade peptidásica do proteassoma.

Investigar alterações decorrentes da indução de neoplasias com DMH e tratamentos com BBI na expressão da proteína de membrana CD44.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação do extrato enriquecido de BBI:

3.1.1. A partir de sementes de *Macrotyloma axillare*

As sementes da *Macrotyloma axillare* foram fornecidas pela empresa Matsuda Sementes Ltda, localizada na cidade de Álvares Machado, interior de São Paulo. Esse cultivar foi obtido do cruzamento artificial de dois cultivares comerciais da *Macrotyloma*: *Archer* (Austrália) e *Guatá* (IZ). O nome comercial do cultivar lançado comercialmente no ano de 2004 e utilizado nesse trabalho é feijão *Java*.

Para se obter as melhores condições para extração protéica das sementes, essas foram moídas cruas em liquidificador para obter um extrato rico em inibidores. Para cada preparação foram utilizadas cerca de 100g de sementes de *M. axillare*. Preparou-se uma suspensão do pó a 20% p/v em tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5, contendo ácido ascórbico 0,5%. A suspensão obtida foi agitada por 12 horas a 4° C. A mistura foi filtrada em gaze e o bagaço retido foi lavado com o veículo extrator até completar o volume de 2 litros, procederam-se as transferências quantitativas. O material foi mantido em banho de gelo durante todo o processo de extração. O extrato bruto obtido foi submetido à centrifugação a 6.500 x g por 30 minutos, para remoção de fibras insolúveis presentes.

O extrato bruto centrifugado foi submetido a 85°C, em banho-maria, por 30 minutos e, em seguida, resfriado rapidamente em banho de gelo. O material proveniente desse tratamento foi submetido à centrifugação a 6.500 x g, por 30 min. Procedeu-se a precipitação do extrato bruto, com a adição de volumes crescentes de etanol PA a 95,5°GL a -20°C até atingir a concentração final de 60% que é utilizado para precipitação de lectinas e 80% utilizado para precipitação de BBI (SANTOS, 2006). Ressuspendeu-se o precipitado em água destilada para posterior preparação da ração.

3.1.2. A partir de sementes de *Glycine max*

As sementes de *Glycine max* (soja) conhecidas como sementes de soja foram compradas em supermercado no comércio local, na cidade de Ouro Preto, Minas Gerais.

A extração protéica das sementes de soja foi realizada segundo metodologia descrita por (YAVELOW *et al.*, 1985). Sementes de *Glycine max* trituradas em liquidificador foram delipidadas com cinco volumes de acetona P.A. As proteínas foram extraídas acrescentando-se 10% p/v em etanol a 60% por 1 h à 55 °C com agitação constante. Após o período de extração, a suspensão foi filtrada em gaze e acidificada com HCl até pH 5,3. O filtrado foi submetido à centrifugação a 6.500 x g por 30 minutos. Ao precipitado acrescentou dois volumes de acetona, centrifugou-se a 6.500 x g por 30 minutos. Ao precipitado foi adicionada água destilada para posterior preparação da ração.

3.2. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram determinadas pelos métodos colorimétricos utilizando os reagentes de *Folin-Ciocalteu* (LOWRY *et al.*, 1951). O padrão de proteína utilizado como referência foi a soro albumina bovina (BSA: *Merck*), em soluções de 20 a 100µg/mL para obtenção da curva-padrão.

3.3. Caracterização do BBI por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%

As amostras provenientes dos procedimentos utilizados para purificação do inibidor foram identificadas e caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os suportes eletroforéticos utilizados eram géis de poliacrilamida de separação a 12% e de concentração a 5%, preparados em condições desnaturantes, segundo o método de Laemmli, (1970).

3.4. Ensaio enzimáticos

3.4.1. Atividade anti-tripsina bovina

A determinação da atividade trípica foi realizada de acordo com Kumar *et al.* (2002). O substrato usado foi o cloridrato de *N*- α -benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (DL-BApNA), que foi preparado dissolvendo-se 196 mg do composto em 5mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para obter uma concentração final de 9×10^{-2} M. Esta solução foi mantida no congelador como solução estoque e diluída no momento do uso com Tris-hidroximetil-aminometano (Tris-HCl) 0,1M contendo CaCl₂ 20mM pH 8,1 para a concentração de 9×10^{-4} M.

O tubo teste era constituído dos seguintes reagentes: DL-BApNA 250 µL, tripsina 25 µL a uma concentração de 0,05 mg/mL e 20-100 µL das frações de purificação do inibidor, previamente diluídas em tampão NH₄HCO₃ 0,01M pH 8,5. O tubo branco era constituído de 250 µL de substrato e 120-200 µL de água, enquanto que o tubo controle de atividade enzimática continha 250 µL de substrato, 25 µL de enzima e 20-100µL de água.

Os tubos de reação foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 37 °C por 40 minutos. Após esse tempo, adicionaram-se 250 µL de ácido acético 60%v/v para paralisar a reação e posteriormente quantificar a atividade enzimática pela medida da absorbância a 410 nm.

Para medir de maneira satisfatória a atividade inibitória, as preparações de inibidores foram previamente diluídas em série para obter inibição entre 40 e 60% da atividade da tripsina, pois a faixa de melhor medida situa-se nesse intervalo. Posteriormente, as porcentagens de inibição eram multiplicadas pela diluição para a determinação da atividade inibitória. A cada tubo de ensaio foram adicionados 200 µL de DL-BApNA, 20 µL de tripsina a uma concentração de 0,05 mg/mL e 20 µL do inibidor. Nos tubos brancos foram adicionados 200 µL de substrato e 40 µL de água, enquanto que o tubo controle de atividade enzimática continha 200µL de substrato, 20µL de enzima e 20µL de água.

Os tubos de reação foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 37 °C por 40 minutos. Após esse tempo, adicionaram-se 250 µL de ácido acético 60% v/v para interromper a reação e posteriormente quantificar a p-Nitroanilida formada na reação enzimática pela medida da absorvância a 410nm.

3.4.2. Atividade anti-quimotripsina bovina

A determinação da atividade quimotriptica foi feita de acordo com Kumar *et al* (2002). O substrato usado foi o cloridrato de *N*-α-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida (L-BTpNA) que foi preparado dissolvendo-se 182mg do composto em 5mL de DMSO para obter 9×10^{-2} M. Esta solução foi mantida no congelador como solução estoque e diluída no momento do uso com Tris-HCl 0,1M contendo CaCl₂ 20mM pH 8,1 e DMSO na proporção de 80% e 20% respectivamente, para a concentração de 9×10^{-4} M.

O tubo teste era constituído dos seguintes reagentes: L-BTpNA, a uma concentração de 0,05 mg/mL e frações do inibidor purificado, previamente diluídas em tampão NH₄HCO₃ 0,01M pH 8,5. O tubo branco era constituído de substrato e de água, enquanto que o tubo controle da atividade enzimática era constituído do de substrato, de enzima e de água.

Os tubos de reação foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37 °C por 40 minutos. Após esse tempo, adicionaram-se 250µL de Ácido Acético 60%v/v para paralisar a reação e posteriormente quantificar a atividade enzimática pela medida da absorbância a 410 nm.

Os dados obtidos com essas atividades inibitórias foram usados para a construção da coluna de afinidade de BBI e preparo da ração.

Todos estes procedimentos foram realizados para as duas preparações de BBIs com o propósito de garantir a qualidade do material utilizado no presente trabalho.

3.5. Indução de câncer com DMH no modelo experimental murino

A metodologia descrita a seguir refere-se a dois experimentos independentes, de tratamento com DMH. O primeiro experimento foi realizado para a padronização do modelo de indução de neoplasias com DMH no Laboratório de Enzimologia e Proteômica da UFOP. O segundo experimento consistiu na suplementação da dieta dos animais tratados com DMH com as preparações enriquecidas de inibidores de proteases de *M. axillare* e *G. max*. Todos os protocolos de tratamentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ouro Preto protocolo: 39/2008.

3.5.1. Regime de doses para indução do câncer com DMH – Experimento I

No segundo experimento utilizou-se um grupo de 72 camundongos *Swiss* machos, 50g, com cinco meses de vida, mantidos em gaiolas com ciclo de luz-escuridão de 12 horas. Todos receberam a mesma dieta e livre acesso à água. Os camundongos foram divididos em seis grupos experimentais: controle1, DMH1 tratamento de 6 semanas com o agente químico 1,2 dimetilhidrazina e 6 semanas de latência, controle 2, DMH2 tratamento de 6 semanas com DMH e 12 semanas de latência e controle 3, DMH3 tratamento de 12 semanas e 12 semanas de latência totalizando 24 semanas de tratamento.

Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical em seguida fixados com alfinetes, na posição supino, em suporte de isopor revestido com papel alumínio nas 12^a, 16^a e 24^a semana. Incisões abdominais no sentido caudal-cranial foram realizadas para exposição das vísceras. Os fragmentos do cólon, intestino e glândula anal foram coletados e divididos para as análises bioquímicas, sendo imediatamente imersos em solução fisiológica

para limpeza e congelamento em nitrogênio líquido para serem armazenados em freezer a -80 °C e para análise histopatológica, onde os mesmos foram armazenados em formol 10%.

3.6 Apresentações dos grupos experimentais de tratamento com BBI, vitaminas A, C e E e DMH - Experimento II

Dois meses antes de iniciar o tratamento com BBI todos os animais receberam uma ração da marca “Labina” e um tratamento com anti-helmínticos (Ivermectina 1% borrifada na gaiola uma vez por semana e Albendazol oral diluição 1:200 no frasco de água por 1 dia, dose única).

Nos grupos de tratamento a dieta foi modificada pela adição de uma preparação de inibidores de proteases Bowman-Birk. A ração foi umedecida e misturada com o BBI na concentração final de 0,1% e posteriormente armazenada no freezer. Para garantir que a ração tivesse a concentração ideal, antes de cada preparação foi medido o título de inibição do BBI conforme item 3.4.

No terceiro experimento utilizou-se um grupo de 128 camundongos *Swiss*, machos, 50 g com cinco meses de vida, mantidos em gaiolas com ciclo de luz-escuridão de 12 horas, obtidos do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto.

Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos de tratamento: Grupo (controle): camundongos que receberam a ração normal e injeção com solvente durante toda a duração do tratamento com DMH. Grupo (DMH): camundongos que receberam a ração normal durante todo o experimento e injeções intraperitoneais de DMH 30 mg/kg por 12 semanas. Os outros grupos experimentais foram tratados com injeções semanais de DMH (30 mg/kg) por 12 semanas, uma vez por semana e alimentados com dietas suplementadas com inibidores de proteases e os inibidores associados às vitaminas, sendo eles: Grupo (DMHV): os camundongos foram alimentados com dietas suplementadas com às vitaminas C 142,8 mg/kg e E 71,4 mg/kg, segundo (KENNEDY *et al.*, 2008) e vitamina A 1mg/100g segundo (SAMPAIO *et al.*, 2007) durante o experimento e. Grupo (BBIS): camundongos que receberam uma ração suplementada com 0,1% de BBI de *Glycine max* durante o experimento. Grupo (BBIM): camundongos que receberam uma ração suplementada com 0,1% de BBI de *Macrotyloma axillare*. Grupo (BBISV): camundongos receberam uma ração suplementada com 0,1% de BBI de *Glycine max* + Vitamina C = 142,8 mg/kg, E = 71,4 mg/kg, A = 1mg/100g durante o experimento. Grupo (BBIMV): camundongos que receberam uma ração suplementada com 0,1% de BBI de *Macrotyloma axillare* + Vitamina C = 142,8 mg/kg, E =

71,4 mg/kg, A = 1mg/100g durante o experimento. Assim, os animais foram submetidos aos tratamentos pelos regimes apresentados, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Sumário do experimento II

Grupos	Nº de animais	Dieta	Suplemento	Tratamento
Controle	16	Normal	-	
DMH	16	Normal	-	DMH
DMHV	12	Normal	Vitaminas A,C,E	DMH
DMHS	16	Normal	BBIS 0,1%	DMH
DMHM	16	Normal	BBIM 0,1%	DMH
DMHSV	16	Normal	BBIS 0,1% + VITAMINAS	DMH
DMHMOV	16	Normal	BBIM 0,1% + VITAMINAS	DMH
BBIS*	10	Normal	0,1%BBIS	-
BBIM*	10	Normal	0,1%BBIM	-

DMH, dimetilhidrazina 30 mg/kg 12 semanas.

BBIM = inibidor Bowman-Birk da *Macrotyloma axillare*; e BBIS = inibidor Bowman-Birk de *Glycine max*. * Atividade peptidásica do proteassoma.

A administração do DMH foi realizada essencialmente como descrita para o experimento II, tratados por 12 semanas e tendo um período de latência de 12 semanas. Os camundongos foram eutanasiados após 24 semanas do início do tratamento. Estes foram sacrificados por deslocamento cervical e durante a necropsia fragmentos do cólon, intestino delgado, glândula anal e reto foram mantidos em solução fisiológica em busca de lesões macroscópicas.

Os tumores encontrados foram fotografados. Os fragmentos dos órgãos foram divididos para análises histopatológicas sendo fixados em formaldeído tamponado a 10% (pH 7,2) e para as análises bioquímicas armazenados em freezer -80°C.

3.7 Análises histopatológicas: fixação e processamento do material para microscopia óptica

Os fragmentos dos órgãos obtidos durante a necropsia foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100%), diafanizados em dois banhos de xilol e embebidos em parafina. Após o processamento, as amostras foram incluídas em parafina. Os blocos obtidos foram submetidos à microtomia para a obtenção de quatro cortes semi-seriados com espessura de 4 µm.

Os cortes foram desparafinizados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e então lavados em água corrente. Em seguida,

foram corados pela hematoxilina, por 10 minutos e lavados em água corrente, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado e novamente lavados em água corrente para evitar acidificação excessiva. Posteriormente, foram corados pela Eosina, por 30 segundos. Após a última lavagem em água corrente, foram desidratados, em dois banhos de álcool absoluto e levados à estufa a 56°C para secagem e montados com lamínula e Entellan.

Para as análises das alterações histopatológicas, os parâmetros avaliados qualitativamente foram: presença/ausência de atipias celulares nas camadas mucosa, média e serosa; inflamação na mucosa; necrose; atipias estruturais e hiperplasia de nódulos linfóides. As imagens foram digitalizadas utilizando-se o microscópio Leica DM5000B com microcâmara acoplada e o programa Leica Application Suite (version 2.4.0 R1, Leica Microsystems Ltd, Switzerland).

3.8 Metodologias para avaliar a atividade peptidásica do proteassoma

3.8.1 Preparação dos homogenatos

A atividade peptidásica do proteassoma foi realizada utilizando-se 100 mg de homogenatos do intestino delgado e cólon de animais representantes de todos os grupos descritos para o experimento II e III. Após a imersão em placas de Petri contendo solução fisiológica os segmentos intestinais foram lavados extensivamente com o auxílio de uma pinça. A preparação dos homogenatos protéicos a partir desses segmentos foi realizada com aproximadamente 100mg de órgão utilizando-se 3mL de tampão 20S (Tris-HCl 25mM, DTT 1mM, Glicerol 10%, EDTA 1mM pH 7,4) em homogenizador de tecido do tipo *Potter Elvehjem* e, em seguida, sonicados em Sonifier 250 (Branson) por três vezes a uma frequência de 30W de 40 segundos com intervalo de 15 segundos em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante dessa centrifugação foram submetidos à ultracentrifugação por 3 horas a 100.000 x g. A determinação da concentração protéica no sobrenadante foi realizada utilizando-se o método de Lowry. Para a construção da curva-padrão foi utilizada uma solução de soroalbumina bovina a 100µg/mL em diversas diluições. A integridade das preparações foi avaliada por SDS-PAGE a 12%.

3.8.2 Avaliação das atividades peptidásicas do proteassoma nos grupos experimentais

Nos ensaios da atividade peptidásica do proteossoma foram utilizados os substratos fluorogênicos Cbz- Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina, e Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (BIOMOL *Biotechnology*), para a determinação das atividades semelhantes à tripsina e à quimotrisina, respectivamente. Foram utilizados 15 µg de proteínas totais em 13 µM dos substratos fluorogênicos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e MgCl₂ 10 mM, na presença e, ou, ausência de 20 µM de MG-132 um inibidor clássico do proteossoma. O ensaio foi realizado num volume final de 240µL com incubação de 30 minutos a 37°C. A reação de hidrólise foi interrompida pela adição de 2 mL de etanol. As leituras fluorimétricas foram realizadas nos comprimentos de onda 380 nm (excitação) e 460 nm (emissão) no espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão) e os resultados, expressos em unidades arbitrárias de fluorescência/µg de proteína.

3.9 Preparações dos homogenatos para análise de expressão da proteína CD44

A preparação dos homogenatos protéicos a partir de 100mg de segmentos de intestino delgado e cólon foi realizada com 1 mL de tampão (Tris-HCl 50mM, DTT 1mM, glicerol 10%). Adicionou-se a cada amostra 10 µl de PIC (*Protease Inhibitor Cocktail, Sigma*) e, em seguida as amostras foram submetidas à sonicação conforme por 30 segundos. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante dessa centrifugação foi armazenado -80°C. À fração membranar acrescentou-se 1ml de Tampão Tris-HCl 0,1M pH7,5, SDS 0,1% e de Triton X-100 1%. A suspensão de membranas foi extraída por agitação e fervura durante 5 minutos seguidos de centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos. A integridade das preparações foi avaliada por SDS-PAGE 12% e a quantidade de proteínas estimada através de densitometria.

3.10 SDS-PAGE ensaios de *Western blotting*

Cerca 15 µg da fração enriquecida de proteínas de membrana foram fracionados em gel de SDS-PAGE 12% como descrito por Laemmli (1970). Após a corrida, um dos géis foi corado com Comassie blue. O tampão utilizado para transferência foi Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, etanol 20%. A voltagem aplicada no sistema foi de 25 volts a uma temperatura de 4 °C por 3 horas. Posteriormente, a membrana foi bloqueada por 16 horas a 4 °C com tampão TBST (Tris-HCl 50mM pH 8,3, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05% e leite desnatado em pó 5%) e submetida a imunoblot. Após o bloqueio, a membrana de PVDF foi

lavada três vezes em Tris-HCl 10 mM e incubada com anticorpo primário policlonal/ratos (anti-CD44) na diluição 1:1000 em TBST por 3 horas à temperatura ambiente. O anticorpo não ligado foi removido através de três lavagens da membrana com Tris-HCl 10mM pH7,5. Em seguida a membrana foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com fosfatase alcalina) na diluição 1:1000 em TBST. Após este período, a membrana foi lavada por três vezes durante 5 minutos em Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e, em seguida incubada em tampão de revelação (Tris pH = 9,5, NaCl 5M, MgCl₂ 1M e H₂O q.s.p 100ml). Finalmente, foram adicionados 5mL de tampão de revelação colorimétrica, contendo substratos da fosfatase alcalina NBT (nitro blue tetrazolium)/BCIP(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) Thermo scientific.

3.11 Cromatografias de troca iônica em resina Q-sepharose

Para se obter uma maior purificação do BBI e a partir desta produzir uma coluna de afinidade, o volume total obtido da fração 80% precipitada por etanol (E60-80%) foi aplicado em uma coluna cromatográfica com dimensões de 6,0 cm x 1,5 cm contendo resina trocadora com carga positiva (*Q-Sepharose*[®] - *Pharmacia LKB Biotechnology*) equilibrada em tampão NH₄HCO₃ 0,01 M pH 8,5. Procedeu-se, inicialmente a eluição com o tampão de equilíbrio para remoção do material não ligado e posteriormente com NaCl 1M dissolvido no mesmo tampão para a eluição do material enriquecido. O fluxo cromatográfico foi mantido em 1 mL/min e coletaram-se frações de 4mL. A eluição de proteínas foi monitorada através da leitura da absorvância a 280 e 230 nm e a atividade inibitória pela porcentagem de inibição da hidrólise do DL-BApNA pela tripsina bovina.

3.12 Preparo das colunas de afinidades Sepharose-BBI e obtenção da fração ligante presente em homogenatos de segmentos intestinais

A sepharose N-Hidroxisuccinilamido-ε-aminocaprício-succinilada, foi inicialmente ativada com epicloridina, em seguida procedeu-se a aminação da agarose epóxi ativada a amino agarose; Para a ativação da succinilamino agarose com N-hidróxisuccinimida, lavou-se a succinilamino agarose extensivamente com dioxano para tornar anidra Adicionou-se hidroxisuccinimida e diiciclohexilcarbodiimida em pó à suspensão para uma concentração final de 0,1 M cada, agitando-se, continuamente e posteriormente a reação foi incubada por 70 minutos à temperatura ambiente. Para o acoplamento do ácido ε-aminocaprício: preparou-se

uma solução de ácido ϵ -aminocapróico (2,6 g/100 mL), em NaHCO_3 0,01 M, NaCl 0,9% pH 7,5 e suspendeu-se a resina em três volumes dessa solução. Manteve-se a suspensão à temperatura ambiente por 1 hora, sendo realizada a sua ativação com N-hidróxisuccinimida. Para realizar o acoplamento com BBI, lavou-se, rapidamente, a resina em funil com 50mL de água destilada (para 20g de resina), e transferiu-se, imediatamente, para um béquer contendo 100mg de BBI solubilizado em NaCl 0,9%, 0,01M NaHCO_3 , pH 7,5 (três volumes). Lavou-se a resina e incubou-se com etanolamina 0,1 M pH9,0 por 1 hora à temperatura ambiente. A solução foi misturada no tubo e ficou sob agitação por 12 horas a 4 °C. A sepharose foi lavada por três vezes, com 10 ml de tampão bicarbonato e incubada com 10 ml de glicina 0,2 M, em tampão bicarbonato a 4 °C por 12 horas. A resina sepharose foi colocada na coluna 1 x 10cm e lavada com 25ml de tampão bicarbonato 0,1 M, seguido de 25ml de tampão acetato de sódio 0,1M pH = 4, seguido de 25ml de tampão bicarbonato 0,1M pH 7,5.

Para testar a coluna de afinidade três miligramas de quimotripsina foram aplicadas na coluna contendo BBI em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,8 contendo 10mM de CaCl_2 . A coluna foi lavada com 100 ml de tampão Tris-HCl até zerar (230 e 280nm), seguido de 50 ml de NaCl 0,5M e de 10 ml de HCl 0,1 M coletando frações de 1ml. Cada fração foi submetida ao ensaio de atividade com o substrato L-BTpNA, conforme o protocolo descrito no item 3.4.2.

As amostras protéicas provenientes do intestino delgado e cólon dos grupos experimentais foram submetidos à coluna de afinidade com o BBI. Para isso os órgãos foram retirados do freezer à -80°C, pesados e procedeu-se o preparo dos homogenatos em Potter, utilizando 3 ml de salina fosfatada contendo 1mM de MgCl_2 . Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.000 x g x 10min e o sobrenadante coletado e centrifugado novamente. Ao *pellet* acrescentou-se 2ml de tampão fosfato 50mM contendo 1mM de MgCl_2 pH 7,5. Centrifugou-se o *pellet* a 10.000 x g por 20 min à 4 °C. O sobrenadante recebeu o nome de fração solúvel. O *pellet* obtido da centrifugação 10.000 x g por 20 min foi ressuspensão em tampão fosfato 50 mM pH 7 contendo 1mM de MgCl_2 e 0,1% de Triton X - 100. A suspensão foi sonicada por 30 segundos. Esta mistura foi centrifugada 10.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante (fração lisossomal) aplicado na coluna de afinidade.

A fração lisossomal e a fração solúvel obtidas da centrifugação foram aplicadas na coluna de afinidade e lavadas com 50 ml de tampão fosfato 100 mM, pH 7 contendo 1mM de MgCl_2 . Em seguida a coluna foi lavada com 50 ml de tampão fosfato à 50 mM pH = 7 e posteriormente 20 ml de NaCl 500mM. Procedeu-se a eluição com 10 ml de HCl 0,1M e as frações foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% contendo 0,1% de gelatina e pela

medida da atividade proteolítica utilizando substratos fluorogênicos no espectrofluorímetro conforme ítem 3.13.

3.13 Atividades peptidásicas da fração ligante isolada da coluna sepharose-BBI

Foram preparados estoques de substratos: Boc-Val-Pro-Arg-MCA (1,6mM em DMSO) e 1,6 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA em DMSO. Soluções de trabalho de substratos estoque 100 x diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM, contendo 1 mM de MgCl₂ preparadas no momento do ensaio e mantidas à 4° em banho de gelo.

Foram coletadas alíquotas 40 µL das amostras eluídas da coluna de afinidade e 200 µL da solução dos substratos fluorogênicos. O tampão utilizado para a diluição foi o fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 e MgCl₂ 1 mM. O ensaio foi realizado num volume final de 240µL incubado por 30 minutos a 37 °C cuja interrupção foi feita pela adição de 3 mL de tampão fosfato gelado. As leituras fluorimétricas foram realizadas nos comprimentos de onda 380 nm (excitação) e 460nm (emissão) no espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão) e os resultados, expressos em unidades de fluorescência arbitrária/µg de proteína.

3.14 Análises estatísticas

A análise estatística dos ensaios bioquímicos e proteômicos foram realizados por meio do *software Prisma versão 5*, utilizando-se a análise de variância entre os grupos (ANOVA), distribuição normal dos dados e o teste complementar de Tukey, considerando-se um nível de significância $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção de preparações dos inibidores de proteases de *G.max* (BBIS) e *M. axillare* (BBIM) é muito importante para o emprego em estudos experimentais que visam avaliar a atividade anticarcinogênica específica destes inibidores. Assim sendo, a sua atividade enzimática foi determinada para a preparação da ração suplementada com os inibidores citados e para o preparo da coluna de afinidade de BBI.

Para avaliar a qualidade da ração enriquecida com BBI foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, como descrito no item 3.4. Pode-se verificar no Anexo A (Figura 1A), que ambas as preparações apresentaram-se confiáveis para serem utilizadas no presente trabalho. No entanto, o extrato de BBIS apresenta duas proteínas de menor massa molecular, conhecida como Lunasina (HERNANDEZ-LEDESMA *et al.*, 2009), que possivelmente estão presentes nas preparações utilizadas nesse trabalho. Nas preparações de BBIM, observaram-se bandas únicas nos géis de SDS-PAGE.

Parâmetros de purificação foram utilizados para monitorar a quantidade e a qualidade das preparações de BBI para o preparo da ração ao longo do experimento. Esse controle foi baseado no monitoramento da inibição de hidrólise dos substratos específicos para tripsina e quimotripsina.

O BBIS foi obtido por técnica descrita por Kumar *et al.*, (2002) e rendeu um material com boa atividade específica e um bom rendimento em massa de proteínas. Porém essa técnica não garante uma purificação tão refinada quanto à utilizada para a obtenção de extratos concentrados de BBIM (SANTOS, 2006). Assim, o grau de pureza do BBIS é menor do que aquele apresentado pelo BBIM Anexo A (Figura 1A).

Neste sentido, os experimentos foram conduzidos de forma que os animais receberam BBIM e BBIS na mesma dose a qual foi calculada a partir da atividade inibitória total sob a tripsina correspondente à concentração de 0,1% de inibidor BBIS contido na ração conforme recomendado por KENNEDY *et al.*, (1998). Esta padronização se fez necessária, pois, as estruturas ativas dos dois inibidores BBIM e BBIS diferem substancialmente na seqüência de aminoácidos e em valores da suas constantes inibitórias sob tripsina e quimotripsina. O BBIM apresenta constante de dissociação de aproximadamente dez vezes menor que a constante do BBIS para tripsina (BILLINGS *et al.*, 1991).

4.1 Alterações de peso e consumo de ração ao longo do tratamento

Durante todo o tratamento, os animais foram acompanhados para o registro das variações de peso e consumo de ração. Conforme ilustrado na Figura 9, não houve diferenças significativas de peso entre os animais nas fases iniciais, intermediária e no final do experimento. Dessa maneira, prejuízos nutricionais que pudessem provocar perda de peso devido a uma possível inibição da digestibilidade de proteínas contida na ração dos animais tratados com BBI, não foram observados nessas condições experimentais.

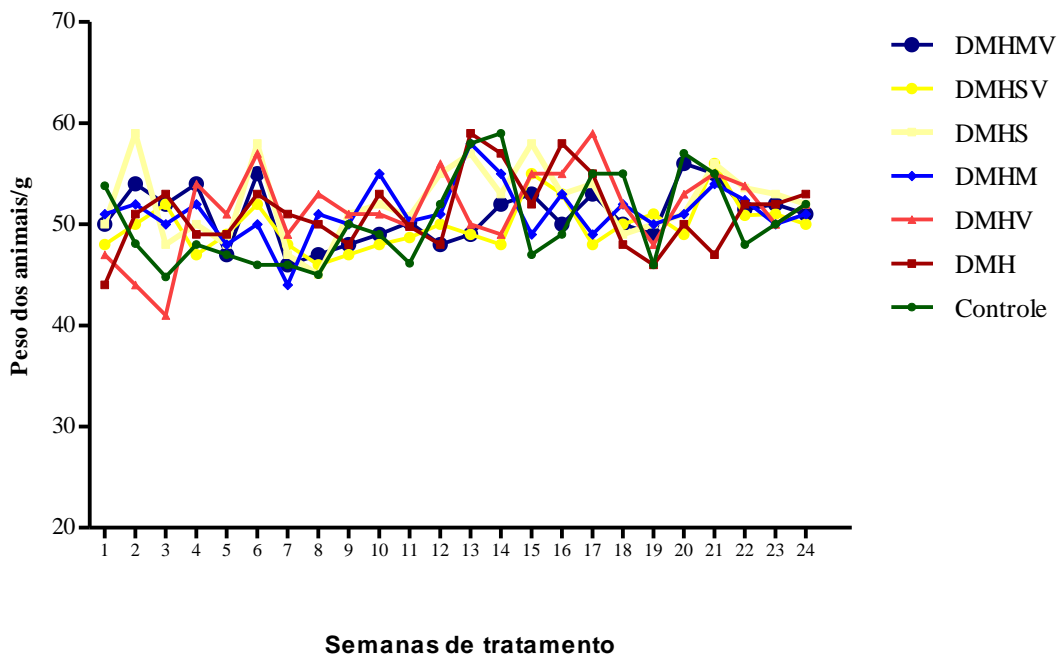


Figura 9. Acompanhamento do peso dos animais submetidos aos tratamentos. Efeito da dieta com inibidores de proteases e tratamento com DMH sobre o peso durante o tratamento. Os pontos da figura representam média dos pesos observada nos grupos experimentais.

Estudos de biodisponibilidade indicam que aproximadamente metade do BBI administrado via oral, é absorvido e distribuído pelo corpo, graças à habilidade do BBI resistir à ação de enzimas digestivas e chegar com mais de 90% na forma intacta ao cólon (KENNEDY *et al.*, 2003).

Armstrong *et al.* (2000) realizaram estudos com pacientes portadores de leucoplasia oral e observaram que estes toleraram bem a administração oral do concentrado de inibidor de soja, não apresentando reações alérgicas, sinais de toxicidade e alterações significativas de exames laboratoriais.

Os valores médios do peso de ração consumida pelos diversos grupos de camundongos tratados estão representados na tabela 2. Não foram observadas diferenças

significativas entre os diferentes grupos experimentais em relação ao consumo da dieta por animal (ANOVA com $p < 0,05$), sugerindo que a suplementação de alimentos com BBI não altera a aceitação dos mesmos, pelos camundongos nas condições experimentais.

Tabela 2. Consumo de ração pelos animais durante o experimento

Grupos	Consumo Ração(g) Dia/Animal
Controle	5,45
DMH	5,09
DMHV	5,10
DMHS	5,95
DMHM	5,78
DMHSV	5,91
DMHMV	5,96
BBIS*	5,40
BBIM*	5,86

4.2 Mortalidade dos camundongos durante o experimento

Considerando que os experimentos se constituíram de tratamentos crônicos, iniciados em camundongos com cinco meses de idade, admitiu-se a possibilidade de morte natural, ao acaso, em todos os grupos experimentais. Como pode ser visto na Figura 10, houve uma mortalidade de aproximadamente 25%, em todos os grupos experimentais. Os casos de mortalidade surgiram durante o período de indução de maneira aleatória em todos os grupos incluindo o grupo-controle. Observa-se um aumento da mortalidade ao final da administração do DMH e estabilização da sobrevida no período de latência. Não foram encontradas alterações macroscópicas nos animais que morreram antes da 12^a semanas de tratamento.

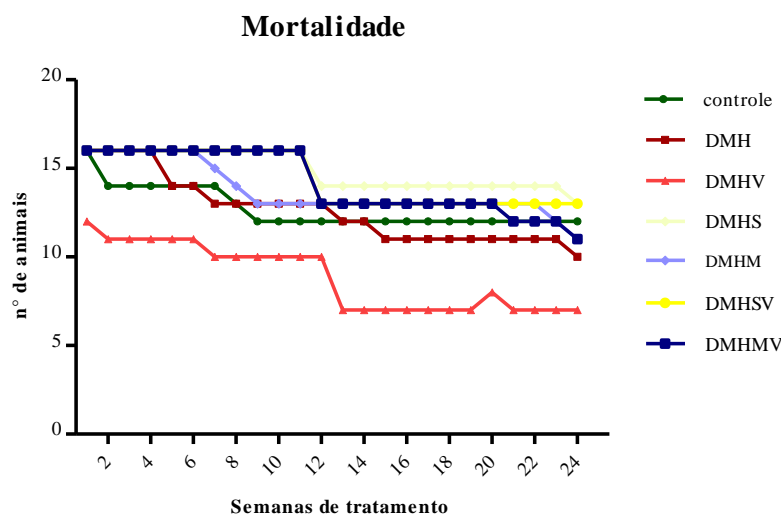


Figura 10. Percentagem de mortalidade dos animais ao longo do tratamento. O gráfico representa os sete grupos de experimentais. Não houve diferença significativamente diferente entre os grupos estudados.

4.3 Alterações histopatológicas: observações macroscópicas e microscópicas

Em humanos e em modelos experimentais, a evolução do câncer colo-retal envolve o desenvolvimento de criptas aberrantes, seguida por pólipos adenomatosos iniciais, formação de pólipos avançados e finalmente, o câncer (FORMAN *et al.*, 2004). Geralmente, as lesões primárias quando não tratadas levam ao desenvolvimento de lesões neoplásicas no cólon e reto (HAMILL *et al.*, 2002).

O DMH induz a proliferação de tumores no cólon em grande número, principalmente no sigmóide e reto, podendo, ocasionalmente, ocorrer ao redor da junção duodeno-jejunal. A preferência pelo cólon é explicada pela proliferação celular mais intensa, induzida pelo DMH, nesse local, principalmente no segmento distal do que no restante do intestino. Essa tendência pode ser também explicada pela deficiência nos mecanismos de reparo do DNA nesse segmento (LORIEN *et al.*, 2004).

A indução de câncer com DMH causa uma importante modificação genética que pode induzir neoplasias em seres vivos que é a metilação da citosina situada entre a sequência de dinucleotídeos (CpG). O padrão de metilação em resíduos de citosina nas sequências CpG é tecido específica causando modificação no DNA. Essa metilação altera a expressão do gene, a manutenção da estabilidade do DNA e da cromatina, desenvolvendo mutações. Tem sido descrito que em células neoplásicas encontradas em animais tratados com DMH, a ocorrência de extensas áreas de hipermetilação do DNA. Assim, a carcinogênese colo retal induzida por DMH está associada à instabilidade genômica e aumento das mutações sítio específicas, devido a hipermetilação nas posições CpG dos genes supressores de tumor e reparo, produzindo um importante mecanismo de silenciamento de gene (CHANG CHIEN *et al.*, 2004).

Além do acompanhamento de alterações de peso e consumo de ração, os animais foram observados quanto ao aparecimento de lesões macroscópicas durante todo o tratamento. Após a décima primeira semana foi constatado que alguns animais pertencentes aos grupos DMH e DMHV apresentavam aumento do volume da glândula perianal. A análise histopatológica da glândula anal revelou a presença de lesões proliferativas, evidenciando mitose (Figura 11).

Após a indução e latência, a glândula anal, o cólon, intestino delgado, foram retirados e avaliados macroscopicamente e microscopicamente.

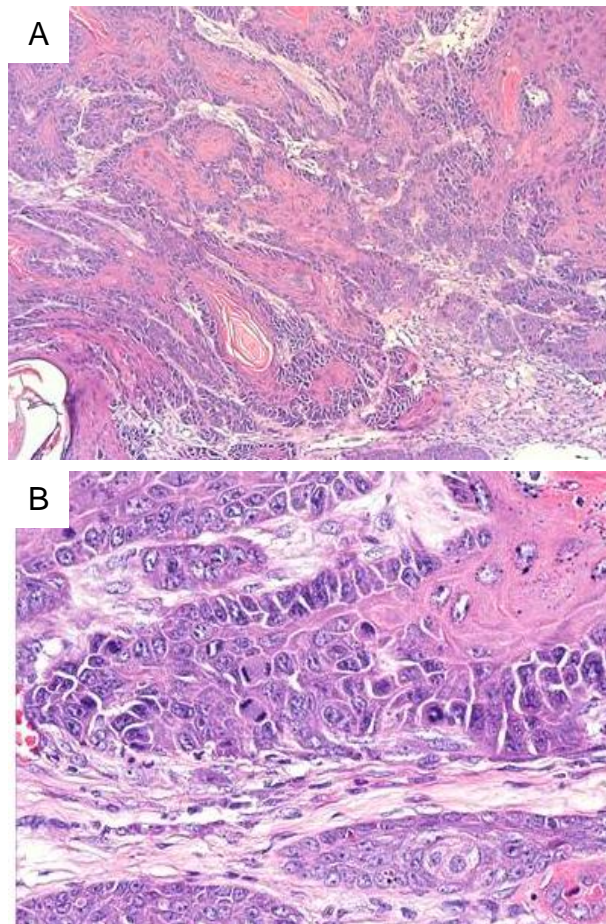


Figura 11. Fotomicrografias da glândula perianal alterada observada nos camundongos dos grupos DMH e DMHV. (A) aspecto histológico de lesões proliferativas na glândula anal; e (B) Aumento da região proliferativa (A = 330X; B = 480X).

Como apresentado na Tabela 3 observou-se 71% de alterações macroscópicas no intestino dos grupos DMH e 67% nos grupos DMHV. Em relação aos demais grupos de tratamentos não foram encontrados alterações. Lesões displásicas e neoplásicas ocorreram em 56 e 33% no cólon e intestino delgado entre os animais do grupo DMH. Além disso, observaram-se reações inflamatórias nesses órgãos nos grupos DMH e DMHV. A Tabela 4 apresenta resultados semelhantes para a glândula anal apresentando resultados ainda mais evidentes no que diz respeito aos efeitos protetores dos BBIM e BBIS.

Desta maneira, observa-se uma drástica redução na ocorrência de neoplasias e lesões nos grupos que receberam BBIS e BBIM. Não foi observada proteção no grupo de animais que receberam apenas vitaminas. Além disso, também foi constatada resposta inflamatória acentuada nos animais dos grupos DMH e DMHV. Segundo Laranjeiras *et al.*(1998), a maior

freqüência de neoplasias induzidas com DMH pode ser detectada em torno dos 112 dias (16 semanas) após a indução.

Assim, esses resultados apontam um efeito benéfico e preventivo, da adição de 0,1% de BBI na dieta contra a indução de neoplasias com DMH. Desta maneira, observa-se uma drástica redução na ocorrência de neoplasias nos grupos que receberam BBIS E BBIM.

Tabela 3. Porcentual de camundongos que apresentaram alterações macroscópicas e microscópicas no cólon e intestino nos diferentes grupos experimentais

Grupos de Tratamento (n)	Alterações macroscópicas		Lesões Displásicas e Neoplásicas		Inflamação	
	Intestino (%)	Colon (%)	Intestino (%)	Colon (%)	Intestino (%)	Colon (%)
Controle (6)	0	0	0	0	0	0
DMH (9)	71	45	56	33	45	56
DMHV (6)	67	50	62	17	83	50
DMHS (6)	0	0	0	0	0	0
DMHSV (6)	0	0	0	0	0	0
DMHM (6)	0	0	0	0	0	0
DMHMV (6)	0	0	0	0	0	0

Tabela 4. Porcentual de camundongos que apresentaram alterações macroscópicas e microscópicas na glândula anal pertencentes aos diferentes grupos experimentais

Grupos de Tratamento (n)	Alterações Macroscópicas (%)	Lesões displásicas Neoplásicas (%)	Inflamação (%)
Controle (6)	0	0	0
DMH (9)	88	66	55
DMHV (6)	33	50	83
DMHS (6)	0	0	0
DMHSV (6)	0	0	0
DMHM (6)	0	0	0
DMHMV (6)	0	0	0

O presente estudo corrobora com os resultados obtidos por (Kennedy *et al.*, 1993; 1998), que mostra a capacidade de supressão do câncer pelos BBI purificados ou de concentrados de inibidores de proteases de soja, observada em diferentes espécies animais como camundongos, ratos e hamsters. Este efeito supressor pode ser detectado em diferentes órgãos como cólon, pulmão, fígado, esôfago e células de origem hematopoética quando os Inibidores Bowman Birk ou suas preparações foram administrados na dieta, ou por aplicação via intraperitoneal.

Os cortes histológicos apresentados nas Figuras 12 e 13 representam exemplos das alterações observadas nos diferentes grupos experimentais.

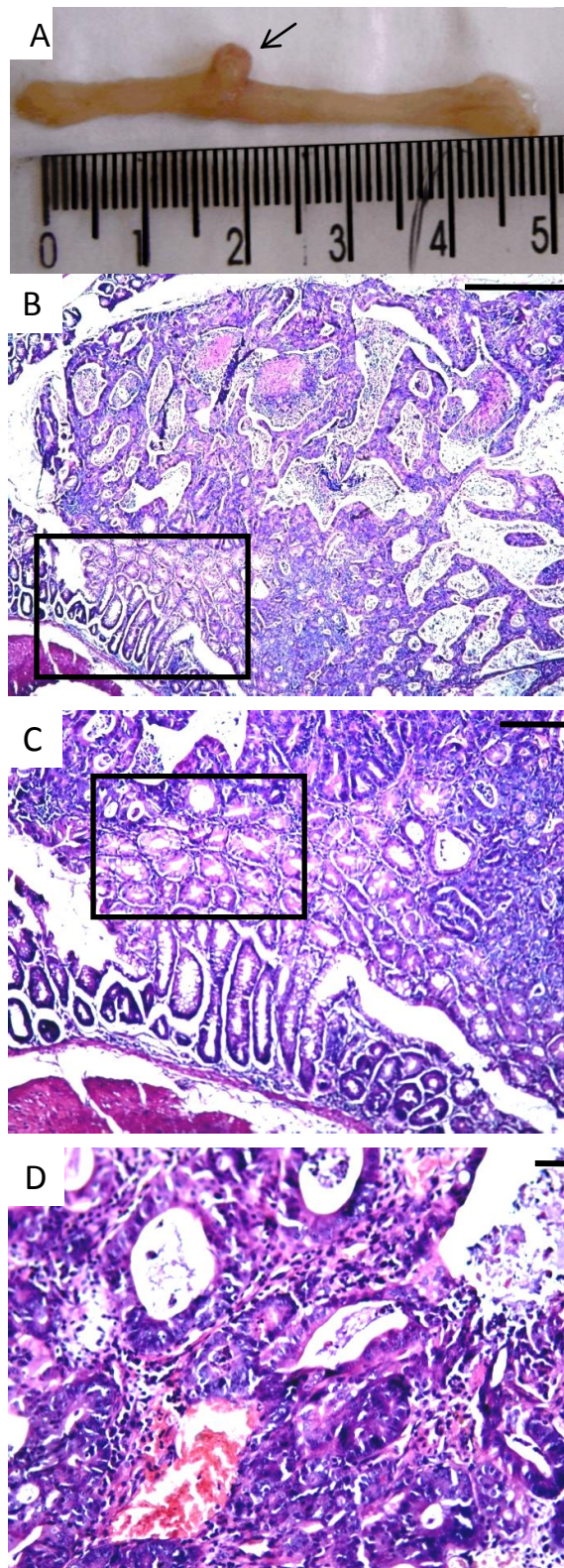


Figura 12. Fotomicrografias do cólon de animais submetidos ao tratamento com DMH. (A) Lesão macroscópica no cólon (pólipo). (B) Aspecto histológico de lesão polipomatosa; (C) inserção do pólipo na mucosa(D) maior aumento da região delimitada em C mostrando detalhes da arquitetura do pólipo. Hematoxilina e Eosina – HE. Barra = 50 μ m.

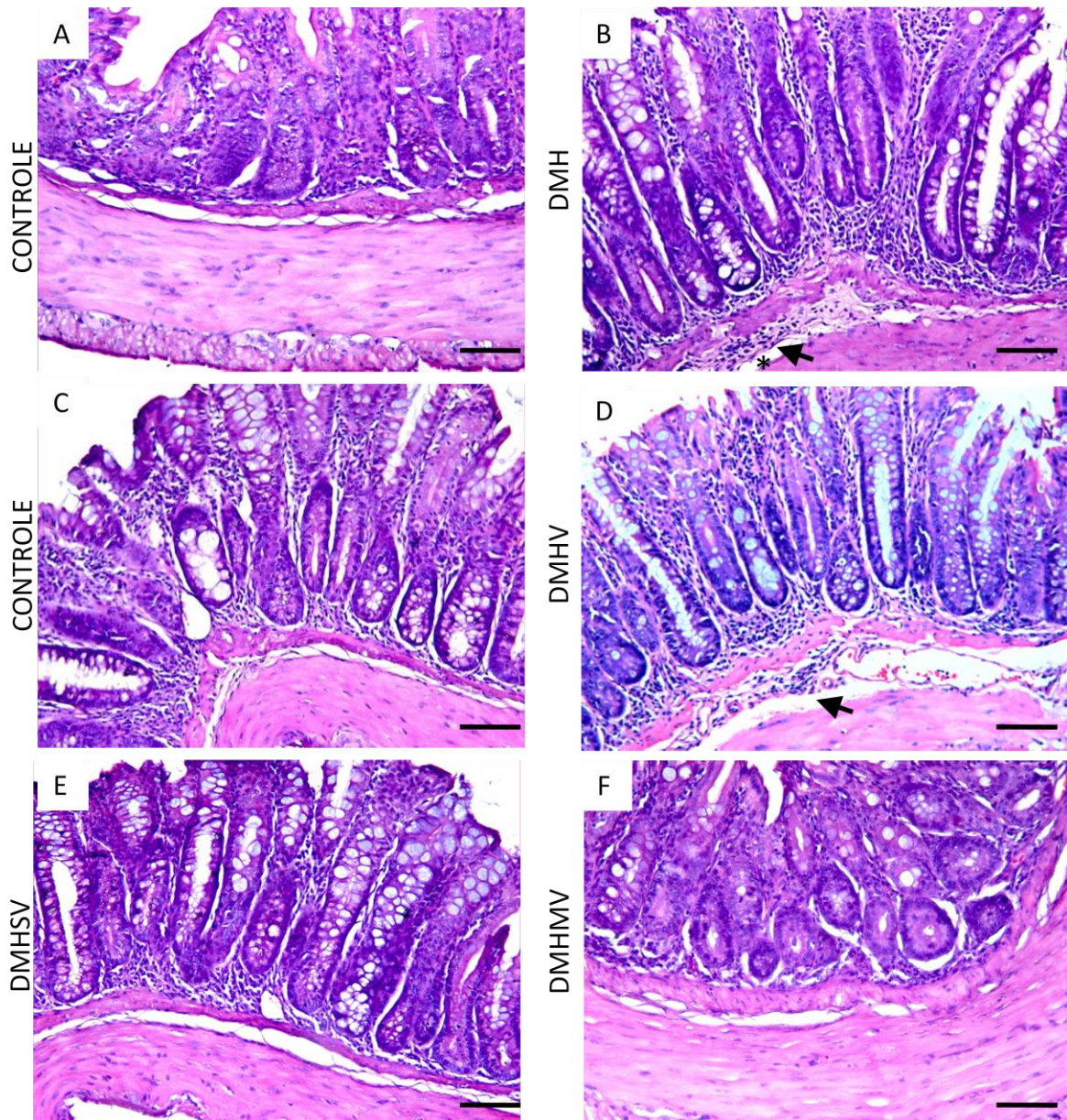


Figura 13: Fotomicrografias do cólon de animais controles ou submetidos ao tratamento com DMH associado ou não ao tratamento com BBIS, BBIM ou Vitaminas. (A) Aspecto histológico normal em animais controles; (B) infiltrado inflamatório (seta) e edema (asterisco) na camada muscular em animais do grupo DMH; (C e D) ausência de infiltrado inflamatório em animais dos grupos DMHS e DMHM demonstrando aspecto histológico normal; (E) presença de infiltrado inflamatório na camada muscular (seta) em animais do grupo DMHV e (F) aspecto histológico normal representativo dos animais dos grupos DMHSV e DMHMV. Hematoxilina-Eosina. Barra = 50 μ m.

A Figura 12 representa fotomicrografias do cólon de animais submetidos ao tratamento com DMH, demonstrando os aspectos histológicos das lesões polipomatosas, bem como sua inserção na mucosa com detalhes da arquitetura do pólipos encontrado nos animais desse grupo. Na Figura 13 são encontradas fotomicrografias do cólon de animais dos diferentes grupos experimentais, demonstrando o aspecto histológico normal desse órgão nos animais que receberam tratamento com BBI, semelhante aos animais do grupo Controle. Entretanto, nos animais dos grupos DMH e DMHV foram observados intenso processo inflamatório na camada muscular.

A literatura relata uma freqüente associação entre o tecido linfóide e os tumores induzidos pelo DMH, originando em placas linfóides podendo produzir intensa reação inflamatória ao redor do tumor; dentre o infiltrado inflamatório há células como os linfócitos e macrófagos reforçando a hipótese de que há uma resposta imune tipo apresentação de antígeno ao redor do tumor. Têm sido demonstrado, em análises histológicas dos tumores causados por DMH, uma hiperplasia com alto grau de inflamação, (BERRIEL *et al.*, 2005) compatíveis com o que foi observado no atual estudo.

O mecanismo pelo qual os inibidores de proteases agem inibindo a indução química de câncer é desconhecida. Losso (2008) sugere que os inibidores de proteases podem suprimir a carcinogênese pela inibição da expressão do oncogene envolvido na conversão celular para o estado maligno. Estudos *in vitro* têm demonstrado que os inibidores de proteases, como BBI são eficazes como agentes preventivos atuando nos processos iniciais em longos períodos de tempo após exposição cancerígena do DMH (KENNEDY *et al.*, 1996, 1998).

Nesse trabalho foi também avaliado se as vitaminas A, C e E poderiam potencializar a ação do BBI na prevenção do câncer induzido quimicamente. No entanto, como observado na Figura 13 (F) os grupos experimentais que receberam vitaminas e BBI não tiveram alterações histopatológicas em relação ao grupo controle. Entretanto não foi possível, nessas condições experimentais, observar potencialização do efeito protetor do BBI pela suplementação da dieta com vitaminas, pois os efeitos protetores observados nos grupos tratados apenas com BBI, apresentaram efeitos máximos.

Os antioxidantes obtidos da dieta, como as vitaminas A, C e E, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é frequentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (MANJU *et al.*, 2005).

A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção em outros (LI *et al.*, 2005).

4.4 Avaliações da evolução do tratamento com DMH pela medida da atividade quimotripsina-símile na fração lisossomal

Experimentos realizados com objetivo de evidenciar os mecanismos de ação do BBI como agente preventivo do câncer demonstraram o aumento de expressão de enzimas proteolíticas com atividade tripsina e quimotripsina símiles sobre os substratos Boc-val-pro-arg-MCA e Suc-ala-ala-pro-phe-MCA, respectivamente, sobretudo, na fração lisossomal (KENNEDY *et al.*, 1993) Neste trabalho foram realizadas medidas da atividade proteolítica com substratos específicos para tripsina e quimotripsina para enzimas retidas em coluna de afinidade de BBI. Tais enzimas proteolíticas foram consideradas como marcadoras da indução do câncer. Em um experimento foram realizadas coletas de amostras de intestinos ao longo de 12,16 e 24 semanas com o objetivo de tentar, por meio desses marcadores, acompanharem a evolução da indução do câncer.

A Figura 14 representa um gráfico de tendência com o tempo de tratamento em semanas, mostrando a atividade de quimotripsina-símile encontradas nas frações de eluição com HCl 0,1 M da coluna de Sepharose-BBI. Os pontos em preto mostram os resultados dos animais tratados com DMH e sua tendência em relação à atividade média dos controles. A análise do gráfico mostra claramente um aumento de expressão com o tratamento, possivelmente relacionado ao desenvolvimento de neoplasias.

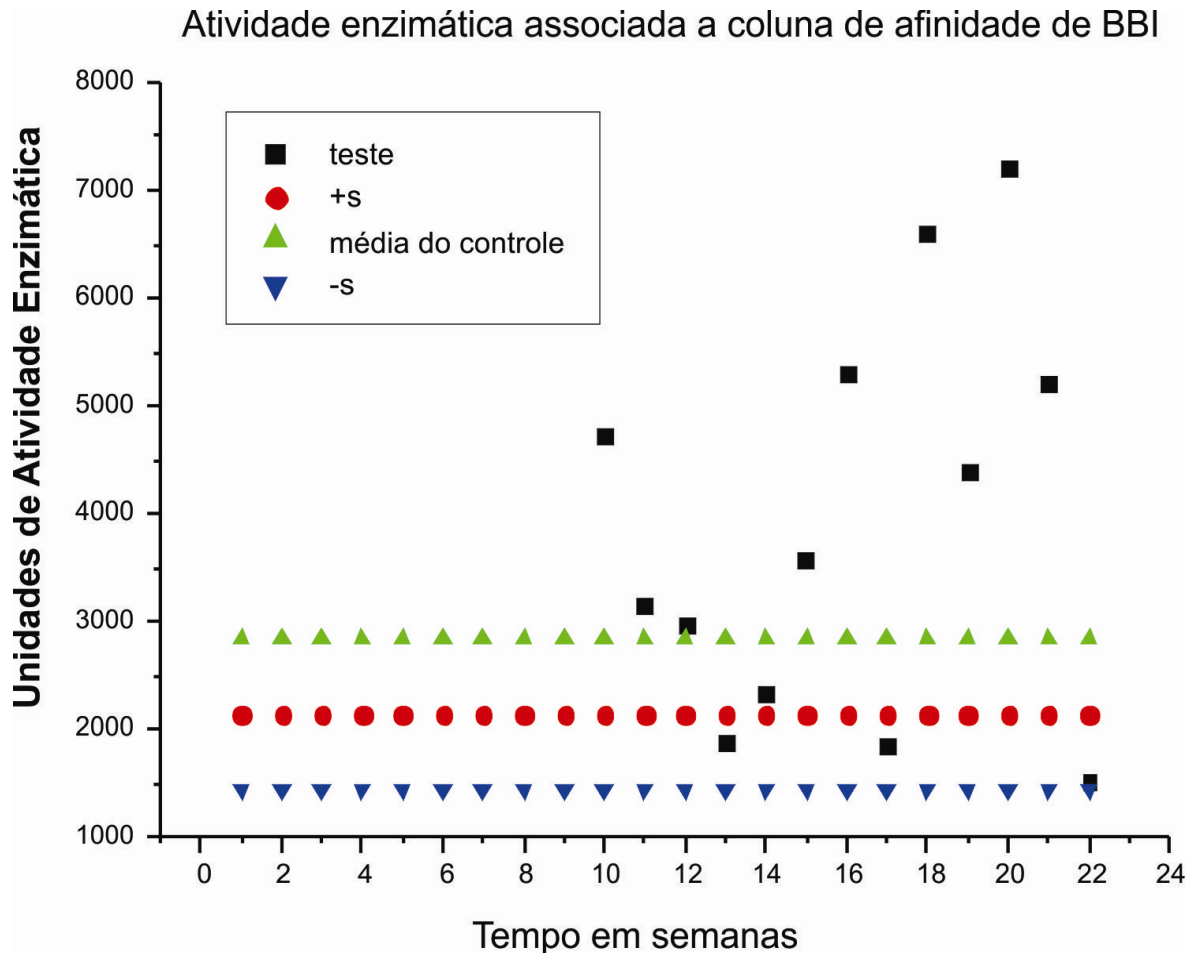


Figure 14. Atividade de quimotripsina da fração lisossomal eluída da coluna de sepharose-BBI. Vermelho representa a média da atividade peptidásica; + (verde) ou - (azul) desvio-padrão (s) do grupo-controle. Preto representa os animais tratados com DMH no experimento II durante 24 semanas de tratamento.

4.5 Atividades proteolíticas tripsina-símile e quimotripsina-símile na fração solúvel e fração lisossomal de camundongos tratados com DMH e BBI

As atividades proteolíticas empregando-se os substratos: Boc-Val-Pro-Arg-MCA e Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA das proteases retidas na coluna de afinidade de BBI foram medidas ao final do tratamento de 24 semanas, tanto para os animais que receberam apenas DMH, quanto para aqueles que foram simultaneamente tratados com DMH e BBI de soja e Macrotyloma. O objetivo desses experimentos foi monitorar a eficiência do tratamento preventivo do BBI por meio da avaliação dos níveis de expressão de enzimas proteolíticas sensíveis à inibição pelo BBI após o tratamento.

As Figuras 15 e 16 mostram que a atividade proteolítica sobre os peptídeos fluorogênicos correlaciona-se com a presença das alterações no intestino e cólon decorrentes do tratamento

com DMH. A baixa atividade observada no controle negativo do cólon e intestino delgado tanto para a fração lisossomal quanto para a fração solúvel e a elevada atividade nas amostras correspondentes aos grupos tratados com DMH revelam uma correlação entre a atividade proteolítica e a presença de lesões neoplásicas.

Por outro lado, os animais tratados simultaneamente com DMH e BBIM e BBIS apresentaram perfil de atividade proteolítica semelhante ao controle negativo. Esses dados demonstram que a atividade preventiva do BBI foi também constatada com a medida desses marcadores.

Estudos sugerem que o BBI, pode ter efeito tanto nos estágios iniciais do câncer como na exposição crônica ao agente cancerígeno (LOSSO, 2008). Embora haja fortes indícios de que esses inibidores de proteases possam afetar tanto a iniciação quanto a promoção dos estágios da carcinogênese, não existem relatos sobre a capacidade de BBI em reverter às alterações celulares em estágios tardios do desenvolvimento tumoral. A inibição de enzimas proteolíticas é apontada como um dos importantes mecanismos de substâncias ativas na carcinogênese (KENNEDY *et al.*, 2002).

Fração Solúvel

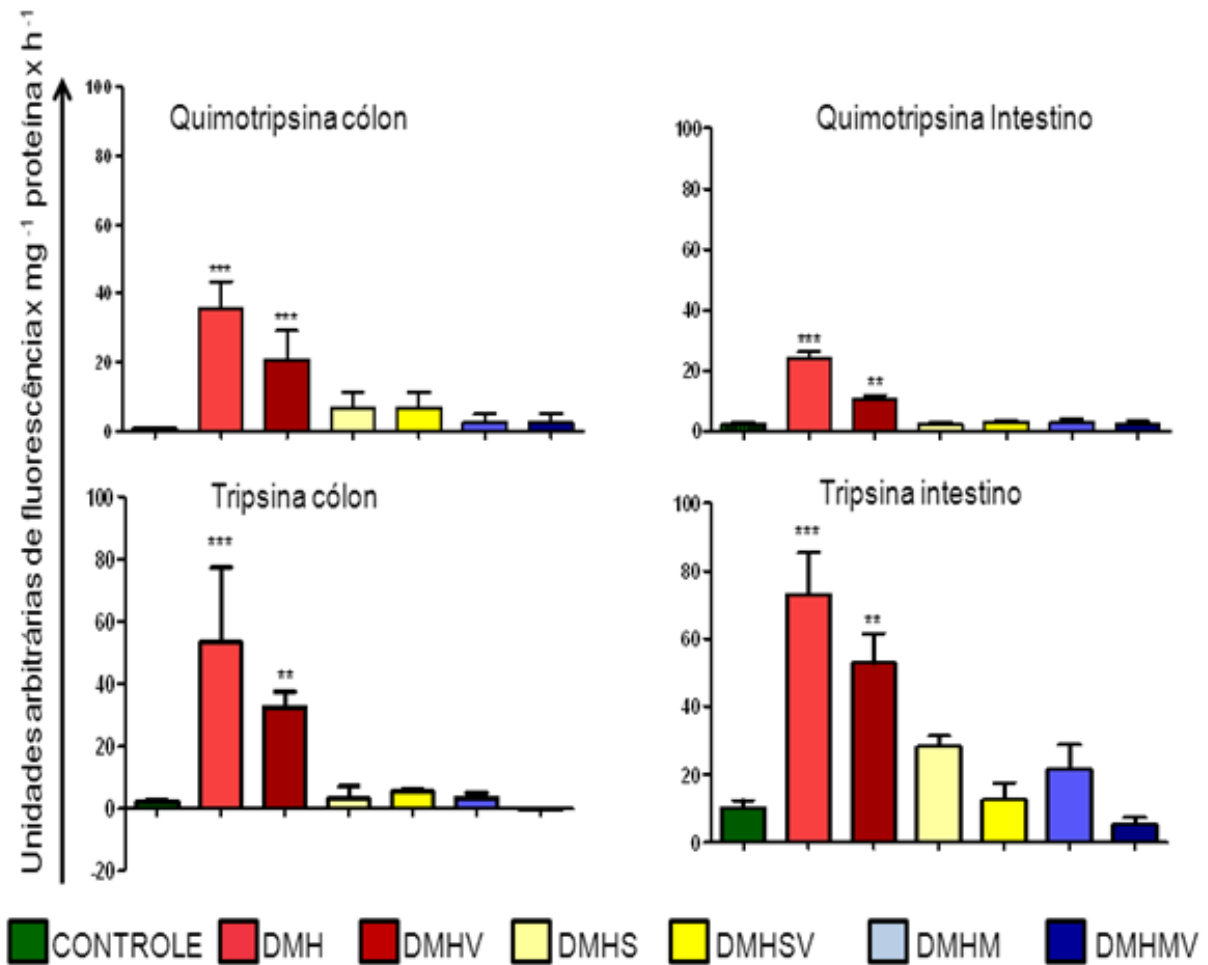


Figura 15. Atividade proteolítica tripsina e quimotripsina-simile na fração solúvel recuperada da coluna de Sepharose-BBI. (DMHS) – tratamento DMH + BBI de soja; (DMHS+VIT) – tratamento DMH + BBI de soja + Vitaminas A, C e E; (DMHM) – tratamento com DMH + BBI de *M. axillare*; (DMHM +VIT) – tratamento com DMH + BBI de *M. axillare* + vitaminas A, C e E. Os resultados dos experimentos representativos são mostrados como médias. As barras representam os erros padrões das médias.*** Foram observados valores significativamente diferentes entre os grupos de tratamento, com $p \leq 0,001$, segundo ANOVA, teste de Tuckey (n=6).

Fração lisossomal

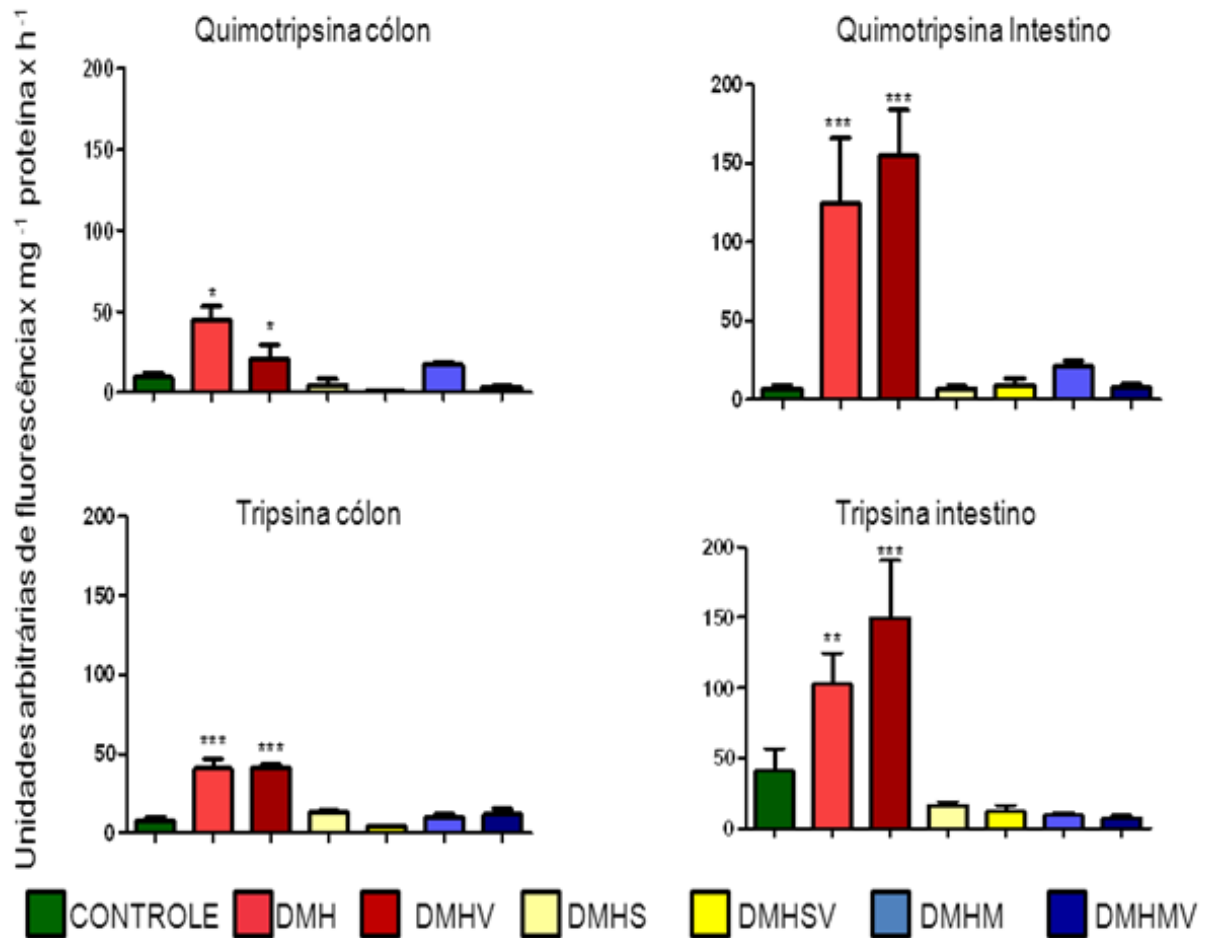


Figura 16. Atividade proteolítica tripsina e quimotripsina-simile na fração lisossomal recuperada da coluna de Sepharose-BBI. (DMHS) – tratamento DMH + BBI de soja; (DMHS+VIT) – tratamento DMH + BBI de soja + Vitaminas A, C e E; (DMHM) – tratamento com DMH + BBI de *M. axillare*; (DMHM +VIT) – tratamento com DMH + BBI de *M. axillare* + vitaminas A, C e E. Os resultados dos experimentos representativos são mostrados como médias. As barras representam os erros padrões das médias. *** Foram observados valores significativamente diferentes entre os grupos de tratamento, com $p \leq 0,001$, segundo ANOVA, teste de Tuckey ($n = 6$).

4.6 Perfis eletroforéticos de proteases ligadas à coluna de afinidade de BBI

As proteases da fração lisossomal de 10.000 x g que interagem especificamente com o BBI recuperadas após a eluição com HCl 0,1M da coluna de afinidade foram analisadas por eletroforese em gel de gelatina. As análises das amostras recuperadas de tecidos com lesões neoplásicas no cólon revelaram um padrão característico de eletroforese com duas bandas de atividade proteolítica no zimograma, com massas moleculares em torno de 45 e 60 KDa (Figura 17). A mesma análise realizada com os tecidos normais observou uma menor expressão da atividade proteolítica na fração correspondente. Esses resultados corroboram com os resultados de Billings *et al.*, (1991), que demonstraram a presença de duas proteínas de 45 e 60 kda em neoplasias intestinais induzidas com DMH.

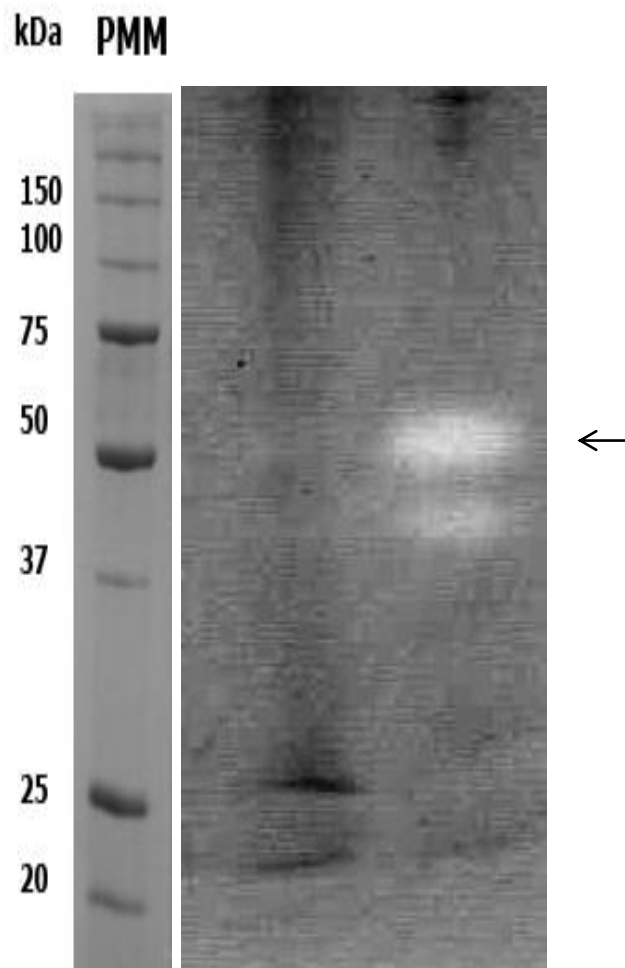


Figura 17. Perfil eletroforético da protease. Gel de gelatina. PMM – Padrão de peso molecular. Linha 1 – SDS-PAGE 15% acrilamida, impregnada de 0,1% de gelatina, as bandas negativas demonstram a atividade proteolítica da fração ligada a coluna de afinidade com o BBI, no controle negativo, Linha 2 – grupo DMH

4.7 Influências do BBI sobre a atividade do proteassoma

Para avaliar a ação do BBI sobre a atividade do proteassoma foi proposto o seguinte delineamento experimental: um grupo controle e dois grupos testes de camundongos *Swiss* receberam durante doze semanas rações *in natura* suplementadas ou não com 0,1% p/p de BBIS ou atividade equivalente de BBIM. Analisou-se a atividade de amostras enriquecidas de proteassoma extraído do cólon. Os resultados mostraram diminuição significativa da atividade de quimotripsina-símile dos grupos tratados com BBIM e BBIS em relação ao controle sem tratamento (Figura 18).

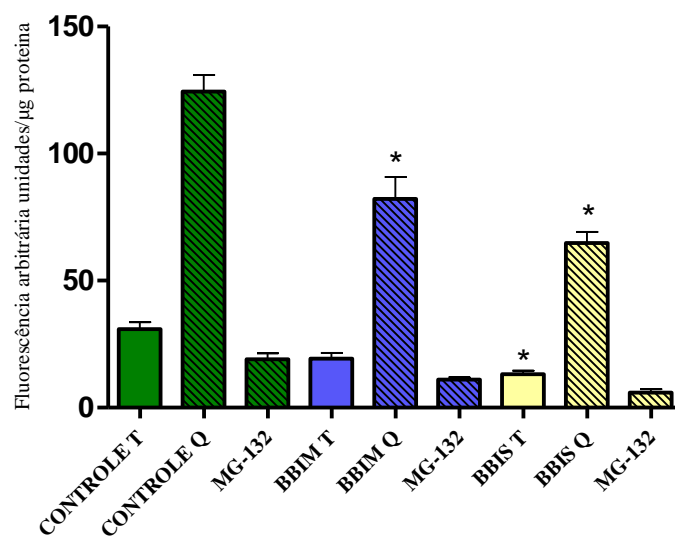


Figura 18. Atividade quimotripsina-símile e tripsina-símile do proteassoma na presença e ausência do inibidor MG132 em camundongos SWISS. Os ensaios foram realizados em seis animais em cada grupo de tratamento, controle – animais que não receberam dieta contendo BBIs. BBIS – animais que receberam a dieta contendo BBI de soja e BBIM. animais que receberam a dieta contendo BBI de *Macrotyloma axillare*. Os resultados dos experimentos representativos são mostrados como médias. As barras representam os erros padrões da média. *** Foram observados valores significativamente diferentes do controle, com $p \leq 0,001$ utilizando o teste de tuckey.

Até o momento poucos trabalhos demonstraram a utilização do BBI como um potencial inibidor das atividades do proteassoma. Estudos realizados por Saito *et al.*(2007) também encontraram inibição da atividade quimotripsina-símile do proteassoma na presença de BBI em cultura de células de osteossarcoma de forma correlacionada à restauração dos níveis de conexina 43 intracelular. Esses resultados associados a uma biodisponibilidade de aproximadamente 50% (BILLINGS *et al*, 1992) deixam claro que esses inibidores são francamente absorvidos pela célula e inibem o complexo proteassoma.

4.7.1 Atividade peptidásica do proteossoma em camundongos tratados com DMH

Ensaio visando utilizar o proteossoma como marcador tumoral foram realizados nesse trabalho medindo a atividade quimotripsina e tripsina-símile do proteossoma durante a indução de câncer. A Figura 19 mostra a atividade quimotripsina-símile e tripsina-símile do proteossoma na presença dos substratos fluorescentes e inibidor MG-132 em camundongos *Swiss*. Os ensaios foram realizados no grupo-controle que compreende animais que não receberam o carcinógeno DMH e grupo DMH. Observa-se que no grupo DMH os resultados apresentam um aumento de aproximadamente de três vezes em relação ao controle.

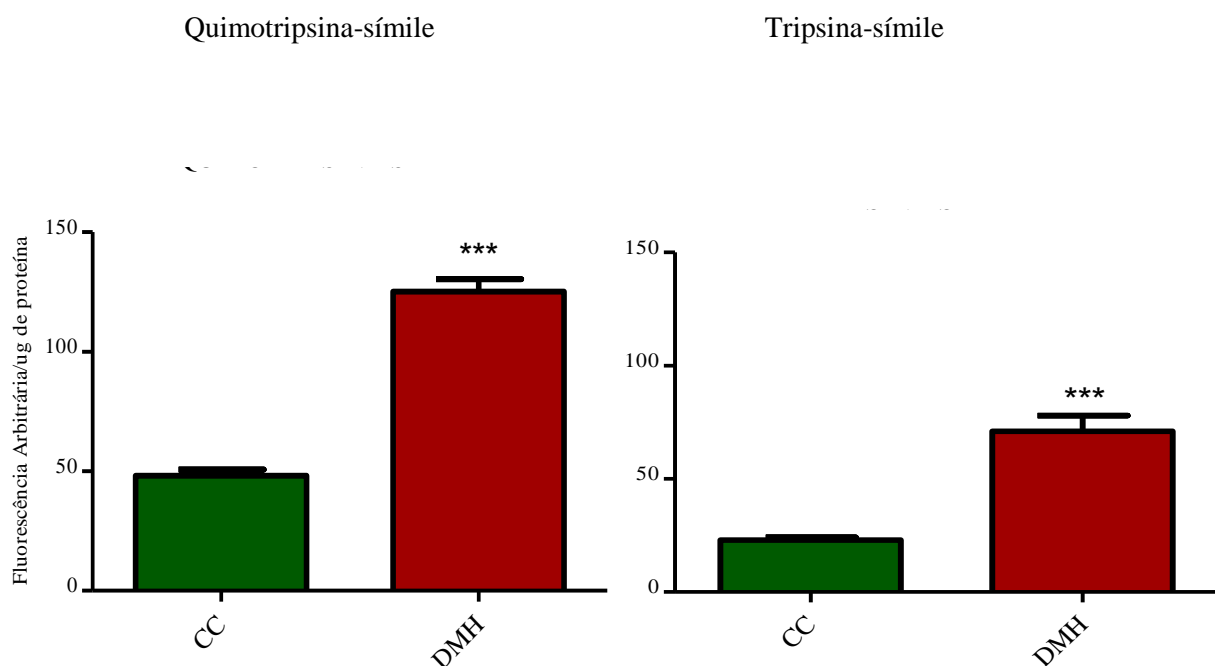


Figura 19. Atividade quimotripsina-símile e tripsina-símile do proteossoma na presença dos substratos fluorescentes em cólon de camundongos *Swiss*. Os ensaios foram realizados em quatro animais em cada grupo de tratamento, controle – cólon de animais que não receberam o carcinógeno DMH durante as 24 semanas de tratamento e DMH – cólon de animais que receberam o carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina. Os resultados dos experimentos representativos são mostrados no gráfico em barras. ***Foram observados valores significativamente diferentes do controle, com $p \leq 0,001$.

4.7.2 Atividade do proteossoma de animais tratados com DMH e BBI

Ao analisarmos as atividades tripsina e quimotripsina-símile do proteossoma enriquecido por centrifugação fracionada, a partir do cólon e intestino, de camundongos tratados com DMH, BBIS, BBIM e Vitaminas (A, C, E), observam-se um aumento significativo da atividade peptidásica frente aos peptídeos fluorogênicos para tripsina e quimotripsina nos grupos de tratamento que manifestaram lesões neoplásicas (DMH e DMHV). Entretanto, nos grupos que receberam a associação do BBIS ou o BBIM com DMH, não foram observadas diferenças significativas de atividade tripsina e quimotripsina símile do proteossoma em relação ao controle Figuras 20 e 21.

4.7.3 Atividade de tripsina-símile do proteossoma no intestino delgado e colon de camundongos

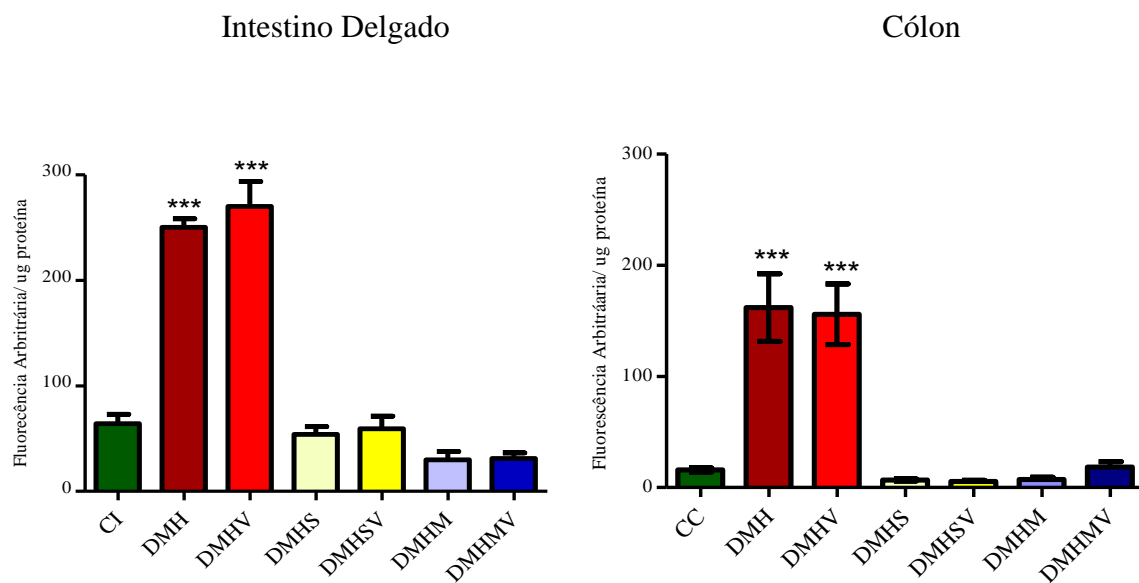


Figura 20. Atividade tripsina-símile do proteossoma na presença e ausência de inibidores em extrato cólon e intestino em camundongos SWISS. Os ensaios foram realizados em seis animais em cada grupo de tratamento, CC controle cólon e CI controle intestino e os resultados dos experimentos representativos são mostrados como médias. As barras representam os erros padrões das médias. ***Foram observados valores significativamente diferentes do controle, com $p \leq 0,001$.

4.7.4 Atividade de quimotripsina-símile do proteassoma no intestino delgado e cólon de camundongos

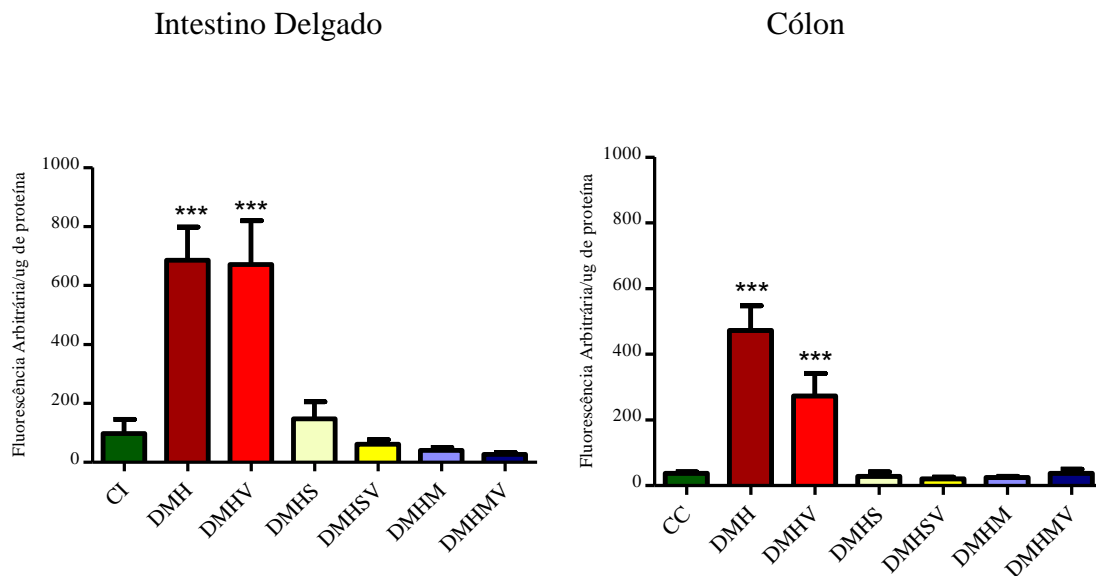


Figura 21. Atividade quimotripsina-símile do proteassoma na presença e ausência de inibidores em extrato cólon e intestino em camundongos SWISS. Os ensaios foram realizados em seis animais em cada grupo de tratamento onde CI controle intestino e CC controle cólon, e os resultados dos experimentos representativos são mostrados como médias. As barras representam os erros padrões da media. * Foram observados valores significativamente diferentes do controle, com $p \leq 0,01$.

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm investigado atividade do proteassoma em situações patológicas, com objetivos de compreender seu mecanismo de ação. Inicialmente, foram demonstrados aumento da expressão de proteassoma em células leucêmicas e alterações em tumores sólidos (STANLEY, 2004).

Pela grande variedade de funções do Sistema Ubiquitina Proteassoma (UPS) e por ocorrerem modificações em estados patológicos, têm sido propostas possibilidades terapêuticas baseado na inibição do proteassoma (HANNA, 2007). Neste sentido, linhagens de células tumorais mostraram-se susceptíveis à indução de apoptose em concentrações muito menores de inibidores do proteassoma do que linhagens de células normais (LERMAN, 2007). A análise proteômica no colo-retal humano revelou aumento significativo de expressão da subunidade $\beta 7$ do proteassoma, demonstrando a importância deste complexo proteolítico no desenvolvimento do tumor (RHO *et al.*, 2008).

Alguns estudos indicam que o bloqueio do sítio quimotripsina-símile do proteassoma pode causar redução nas taxas de proteólise reduzindo a sobrevivência das células tumorais. A maioria dos inibidores específicos da atividade quimotripsina-símile do proteassoma são

capazes de induzir a apoptose de células cancerosas e suprimir o crescimento tumoral em diversos modelos experimentais (CHEN *et al.*, 2005; KISSELEV *et al.*, 2006).

Até o momento foi observado que o BBI inibe a atividade quimotripsina-símile do proteassoma 26S em culturas de células de osteosarcomas. Este efeito pode estar relacionado à sua atividade anti-carcinogênica, uma vez que a inibição do proteassoma 26S promove o acúmulo de substratos intracelulares seguido por uma diminuição da expressão de ciclinas regulatórias do ciclo celular, como: p27Kip1 e p21Cip1/WAF1 (CHEN *et al.*, 2005). O tratamento *in vitro* de células tumorais com BBI leva a um acúmulo de inibidores de kinases-ciclina-dependentes (CKIs) e induz como consequência uma diminuição da expressão de ciclinas, como a ciclina D1 e ciclina E. Este efeito promoveu o bloqueio da divisão celular na fase G1/S após 24 horas de contato com BBI. BBI também suprimiu a expressão de ERK1/2, uma molécula envolvida em transdução ligada à proliferação celular. Essa supressão se dá de forma dose e tempo-dependente (CHEN *et al.*, 2005).

4.8 Correlações da expressão da proteína CD44 e o tecido tumoral

Neste estudo buscou-se estabelecer a correlação entre o padrão de expressão da proteína CD44 e o tecido tumoral induzido pela dimetilhidrazina (DMH). Como demonstrado na Figura 22 houve aumento significativo da expressão da proteína CD44 nos tecidos tumorais em relação ao controle. Nota-se que os animais que receberam DMH e Vitaminas, apresentaram um aumento na expressão da proteína CD44. Esses resultados demonstram que o tratamento com DMH induz também o aumento da expressão de CD44 de forma associada a lesões neoplásicas

A Figura 23 mostra um aumento no padrão de expressão da proteína CD44 no grupo DMH quando comparado com o controle e os grupos DMHS e DMHM.

Observa-se nas Figuras 24 e 25 níveis de expressão da proteína CD44 nos grupos DMHS e DMHM igual aos animais controle.

O marcador de superfície celular, CD44 pode ser expresso de maneira constitutiva (CD44s – Standard CD44) e ainda apresentar formas variantes (CD44v) de expressão as quais vem sendo correlacionados com a progressão neoplásica. As formas variantes de CD44 são resultantes do *splicing* alternativo do seu mRNA. O CD44 age na regulação do tráfego celular, nas interações intercelulares, na internalização e degradação do ácido hialurônico, na promoção de tumores e na transdução de sinais (FRANZMANN *et al.*, 2005; HANLEY *et al.*, 2006).

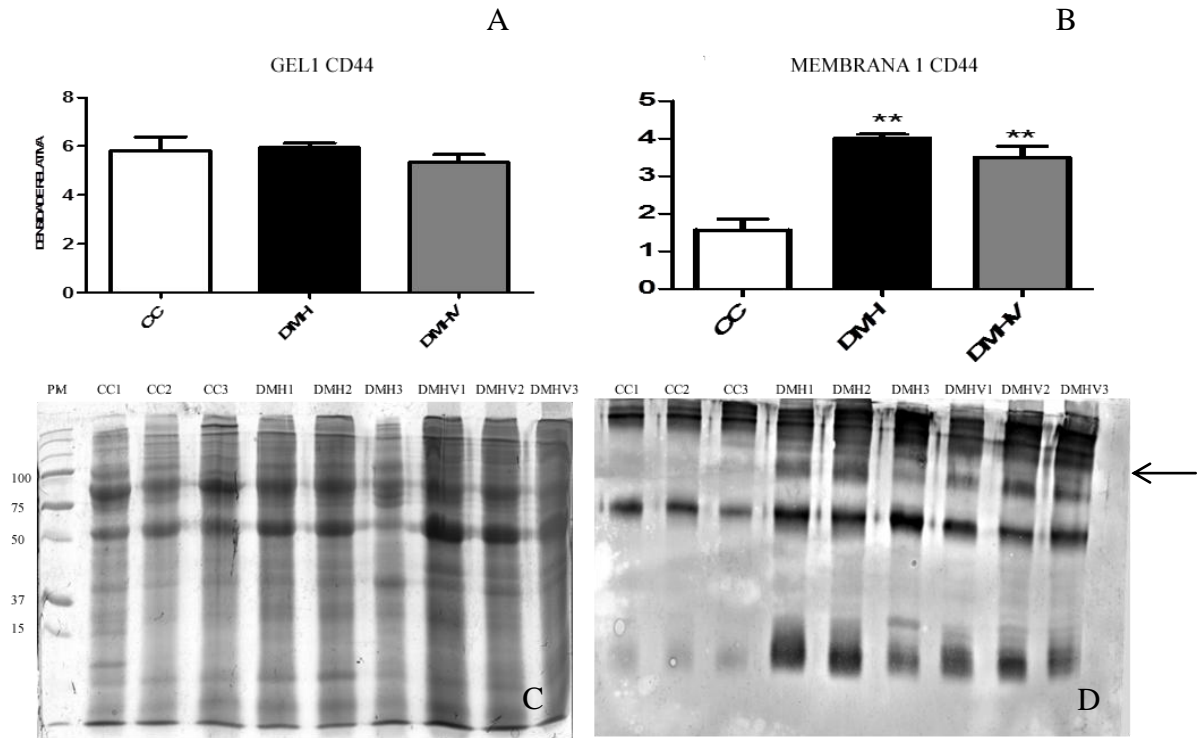


Figura 22. Padrão da expressão da proteína CD44. (A) Gel 1 e (C) densitometria do gel 1, não houve diferenças significativas no conteúdo protéico nos grupos; (B) A membrana1; e (D) densitometria da membrana mostra diferença estatística entre os grupos-controle e DMH e DMH+ vit. * Foram observados valores significativamente diferentes do controle, ANOVA, teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

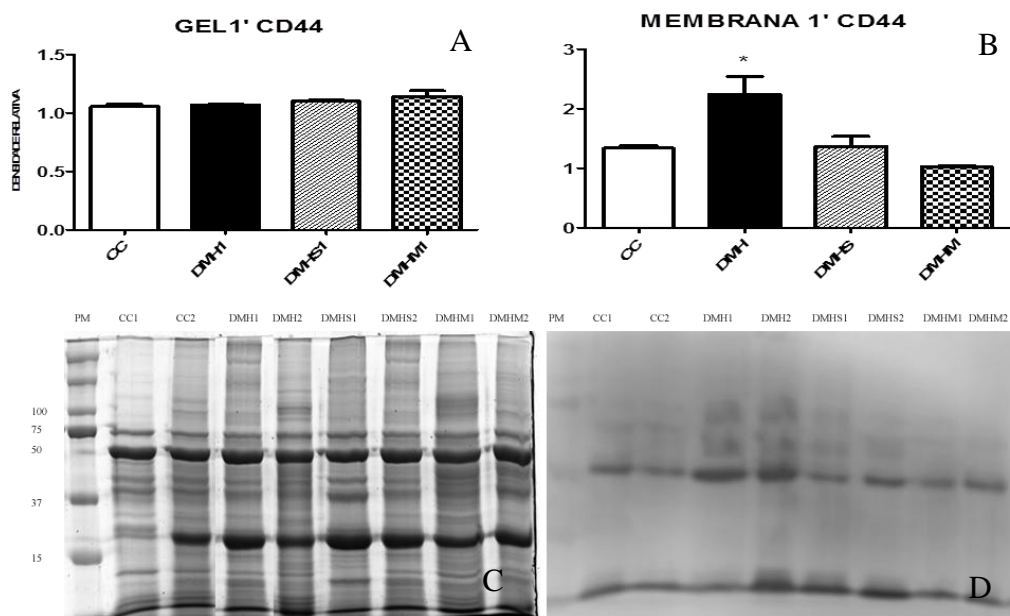


Figura 23. Padrão da expressão da proteína CD44. (A) Gel 1' e (C) densitometria do gel 1', não houveram diferenças significativas no conteúdo protéico nos grupos; (B) a membrana1; e (D) densitometria da membrana mostra diferença estatística entre os grupos-controle e DMH e DMHS e DMHM. Foram observados valores significativamente diferentes do controle para o grupo DMH e valores aproximados do controle para o grupos DMHS e DMHM, com ANOVA, teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

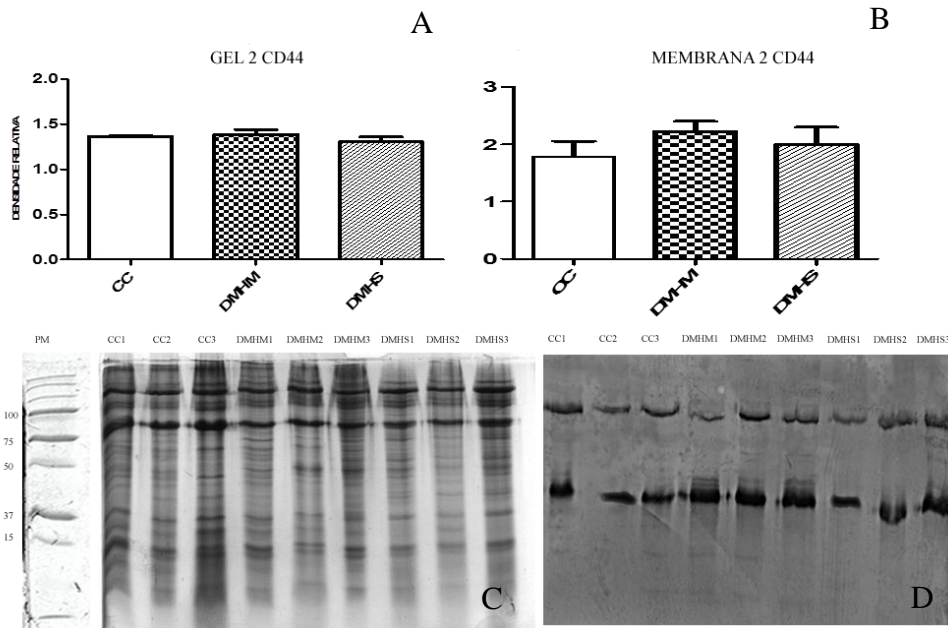


Figura 24. Padrão da expressão da proteína CD44. (A) Gel 2 e (C) densitometria do gel 2, não ocorreu diferenças significativas nos grupos; (B) a membrana2; e (D) densitometria da membrana 2 não mostra diferença estatística entre os grupos-controle e MC e SC. Não foram observados valores significativamente diferentes do controle, ANOVA, teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

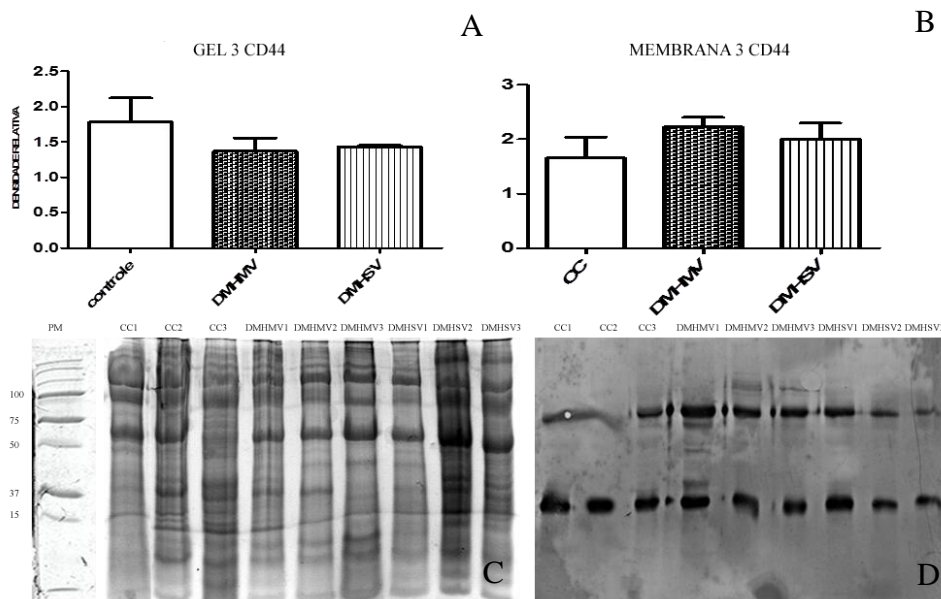


Figura 25. Padrão da expressão da proteína CD44. (A) Gel 3 e (C) densitometria do gel 3, não ocorreu diferenças significativas nos grupos; (B) a membrana3; e (D) densitometria da membrana 3 não mostra diferença estatística entre os grupos-controle e MC e SC. Não foram observados valores significativamente diferentes do controle, ANOVA, teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

A isoforma de 85 KDa, também chamada de CD44s, é predominantemente expressa na superfície de células tumorais. Essa isoforma apresenta uma maior afinidade pelo ácido hialurônico, cuja ligação apresenta um papel central nas propriedades invasivas de tumores (Gonget *al.*, 2005).

5 CONCLUSÕES

Os ensaios realizados com camundongos tratados simultaneamente com BBI e DMH mostraram que esse inibidor purificado de sementes de *G. max* ou de *M. axillare* foi capaz de prevenir a indução de lesões pré-neoplásicas.

- Os três biomarcadores empregados mostraram resultados coerentes no que diz respeito à prevalência destes nas diferentes situações experimentais aferidas, o que demonstra a confiabilidade e a utilidade do modelo experimental proposto.

- Tendo em vista os biomarcadores avaliados pode-se concluir que ocorreu maior aumento da atividade enzimática nas frações lisossomais que na fração solúvel sobre substratos fluorogênicos em homogenatos de tecidos obtidos dos grupos tratados com DMH.

- O aumento da expressão de proteases de 45 e 60 k Da que interagem com a coluna de afinidade de BBI característica da lesão neoplásica intestinal de camundongos tratados com DMH.

- As análises histopatológicas realizadas nesse trabalho indicam que os processos inflamatórios, neoplasias no cólon e glândula anal mostraram uma relação com o aumento da expressão da proteína CD44 em camundongos tratados com DMH. Níveis normais desse marcador foram observados em animais simultaneamente tratados com BBI e DMH que não apresentaram lesões neoplásicas.

- O BBI induz diminuição da atividade do proteassoma em camundongos tratados cronicamente com esses inibidores, demonstrando que são absorvidos e exercem de forma independente do tratamento com DMH influência sobre o proteassoma.

- As células neoplásicas apresentam maior atividade tripsina-simile e quimotripsina-simile do proteassoma em camundongos tratados cronicamente com DMH.

6 PERSPECTIVAS

Esse trabalho apresenta como perspectiva a possibilidade de utilização dos inibidores do tipo Bowman-Birk na efetiva prevenção do câncer induzido quimicamente por agentes tumorais semelhantes à hidrazina e investigação da possibilidade de prevenção de outros tipos de neoplasias. Além disso, o acompanhamento da evolução da indução de neoplasias por meio da atividade do protossoma, expressão da proteína CD44 e atividade proteolíticas associadas à retenção em colunas de afinidade de BBI, poderá permitir uma avaliação precoce ou tardia de outros modelos de câncer.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. The proteasome: structure, function and role in the cell. **Cancer Treat Rev.**, v. 29, p. 3-9, 2003.

AMERIK, A. Y.; HOCHSTRASSER, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1695, p. 189-207, 2004.

ANDRADE, M. H., SILVA, E., AND MARES-GUIA, M. A plausible identification of the secondary binding site in trypsin and trypsinogen. **Braz J Med Biol Res** 23, 1223-1231, 1990.

ARMSTRONG, W. B., KENNEDY, A. R., WAN, X. S., ATIBA, J., MCLAREN, C. E., AND MEYSKENS, F. L., JR. (2000a). Single-dose administration of Bowman-Birkinhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 9, 43-47.

ANBANANDAM, A.; ALBARADO, D. C.; TIRZIU, D. C.; SIMONS, M.; VEERARAGHAVAN, S. Molecular basis for proline- and arginine-rich peptide inhibitor of proteasome. **J. Mol. Biol.**, v. 384, 219-227, 2008.

BÁNKFALVI, A.; KRASSORT, M.; BUCHWALOW, I. B.; VÉGH, A.; FELSZEGHY, E.; PIFFKÓ, J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. **J. Pathol.**, 198, 343-51, 2002.

BANNER, B. F.; SAVAS, L.; BAKER, S.; WODA, B. A. Characterization of the inflammatory cell populations in normal colon and colonic carcinomas. **VirchowsArchiv. B Cell Pathol.**, v. 64, p. 213-20, 1993.

BERRIEL E, HILL M, BARCIA JJ, UBILLOS L, GONZALEZ M, DETJEN G, RONDAN M, NAVARRETE H, OSINAGA E. Simple mucin-type cancer associated antigens are pre-cancerous biomarkers during 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Oncol Rep.**, v. 14, n. 1, p. 219-27, July 2005.

BILLINGS, P. C.; BRANDON, D. L.; HABRES, J. M. Internalization of the Bowman-Birk protease inhibitor by intestinal epithelial cells. **Eur. J. Cancer**, v. 27, p. 903-908, 1991.

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

BILLINGS, P. C.; ST. CLAIR, W. H.; MAKI, P. A.; KENNEDY, A. R. Distribution of the Bowman-Birk protease inhibitor in mice following oral administration. **Cancer Letters**,v. 62, p. 191-197, 1992.

BIRK, Y. Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and chymotrypsin from soybeans. **Biochim. Biophys. Acta**,v. 54, p. 378-381, 1961.

BIRK, Y.; SMIRNOFF, P.; RAMACHANDRAN, J. Photoreactive, active derivatives of trypsin and chymotrypsin inhibitors from soybeans and chickpeas. **Adv. Exp. Med. Biol.**,v. 199, p. 469-481, 1986.

BORRELLO, M. G.; DEGL'INNOCENTI, D.; PIEROTTI, M. A. Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. **Cancer Lett.**,v. 267, p. 262-270, 2008.

BOWMAN, D. E. Differentiation of soybean antitryptic factors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**,v. 63, p. 547-550, 1946.

BRENNA, S. M.; SYRJANEN, K. J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervicalcarcinogenesis. **Med. J.**,SãoPaulo,v. 121, p. 128-132, 2003.

CAVO, M. Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. **Leukemia**,v. 20, p. 1341-1352, 2006.

CHANG CHIEN, C.; WU, M.; TASI, W.; TANG, R.; CHIANG, J.; CHEN, J.; HUANG, S.; WANG, J.; YEH, C. Evaluation of prognosis for malignant rectal gastrointestinal stromal tumor by clinical parameters and immunohistochemical staining. **Dis. Colon. Rectum.**, v. 47, p. 1922-1929, 2004.

CHANG, J. D.; LI, J. H.; BILLINGS, P. C.; KENNEDY, A. R. Effects of protease inhibitors on c-myc expression in normal and transformed C3H10T1/2 cell lines. **Mol. Carcinog.**,v. 3, p. 226-232, 1990.

CHEN, P.; ROSE, J.; LOVE, R.; WEI, C. H.; WANG, B. C. Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birkprotease inhibitor are similar to other trypsin inhibitions. **J. Mol. Biol.**,v. 267, p. 1990-1994, 1992.

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.

CHRISTOFORI, G. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. **Institute of Biochemistry and Genetics**, v. 10, p. 2318-23, 2003.

CUSACK, J. J.; LIU, R.; XIA, L.; CHAO, T.; PIEN, C.; NIU, W.; PALOMBELLA, V.; NEUTEBOOM, S.; PALLADINO, M. NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer model. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 6758-6764, 2006.

CLEMENTEA, A.; DOMONEY, C. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. **Curr. Protein Pept.Sci.**, v. 7, p. 201-216, 2006.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, p. 502-511, 2008.

ELSASSER, S.; FINLEY, D. Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. **Nature Cell Biology**, v. 7, p. 742-749, 2005.

FINLAY, C. A.; HINDS, P. W.; LEVINE, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**, v. 57, p. 1083-1093, 1989.

FONSECA, I.; MOURA NUNES, J. F.; SOARES, J. Expression of CD44 isoforms in normal salivary gland tissue: an immunohistochemical and ultrastructural study. **Histochem Cell Biol.**, v. 114, p. 483-8, 2000.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, Apr. 6(4):273-86. 2007. Review

FORMAN, M. R.; HURSTING, S. D.; UMAR, A.; BARRET, J. C. Nutrition and cancer prevention: a multidisciplinary perspective on human trials. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 223-254, 2004.

FRANZMANN, E. J.; REATEGUI, E. P.; CARRAWAY, K. L.; HAMILTON, K. L.; WEED, D. T.; GOODWIN, W. J. Salivary soluble CD44: a potential molecular marker for head and neck cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 14, p. 735-739, 2005.

FRANZMANN, E. J., REATEGUI, E. P.; CARRAWAY, K. L.; HAMILTON, K. L.; WEED, D. T.; GOODWIN, W. J. Salivary soluble CD44: a potential molecular marker for head and neck cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 14, p. 735-9, 2005.

GALAMB, O.; GYÖRFFY, B.; SIPOS, F.; SPISÁK, S.; NÉMETH, A.; MIHELLER, P.; TULASSAY, Z.; DINYA, E.; MOLNÁR, B. Inflammation, adenoma and cancer: objective classification of colon biopsy specimens with gene expression signature. **Dis. Markers**, v. 25, p. 1-16, 2008.

GARCIA-GASCA, T.; SALAZAR-OLIVO, L. A.; MENDIOLA-OLAYA, E.; BLANCOLABRA, A. The effects of a protease inhibitor fraction from therapy bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. **Toxicology in Vitro**, v. 16, p. 229-233, 2002.

GARIANI, T.; MCBRIDE, J. D.; LEATHERBARROW, R. J. The role of the P2' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin. Studies on P2' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1431, p. 232-237, 1999.

GONG, Y.; SUN, X.; HUO, L.; WILEY, E. L.; RAO, M. S. Expression of cell adhesion molecules, CD44s and E-cadherin, and microvessel density in invasive micropapillary carcinoma of the breast. **Hypatolology**, v. 46, p. 24-30, 2005.

GOODISON, S.; YOSHIDA, K.; CHURCHMAN, M.; TARIN, D. Multiple intron retention occurs in tumor cell CD44 mRNA processing. **Am. J. Pathol.**, v. 153, p. 1221-1228, 1998.

HAMILL, F. A. Cancer-related fatigue syndrome. **Integrative Cancer Therapies, Thousand Oaks**, v. 1, p. 423-424, 2002.

HANLEY, W.; NAPIER, S.; BURDICK, M.; SCHNAAR, R.; SACKSTEIN, R.; KONSTANTOPOULOS, K. Variant isoforms of CD44 are P- and L-selectin ligands on colon carcinoma cells. **FASEB J.**, v. 20, p. 337-339, 2006.

HANNA, J.; FINLEY, D. A proteasome for all occasions. **FEBS Lett.**, v. 53, 2007.

HARRISON, G.; WEED, R. B.; MCGANDY, 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, 1994.

- HASINA, R., AND LINGEN, M. W. Angiogenesis in oral cancer. **J DentEduc** 65, 1282-1290, 2001.
- HERMANOWICZ, M.; ROSSI, D.; DAOU, N.; SERMENT, G.; DUCASSOU, J. **Presse Med.**, v. 16, p. 1430-1, 1987.
- HERNANDEZ-LEDESMA, B.; HSIEH, C. C.; DE LUMEN, B. O. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. **Peptides**,v. 30, p. 426-430, 2009.
- HOOPS, T.; TRABER, P. Molecular pathogenesis of colorectal cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**,v. 11, p. 609-633, 1997.
- HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**,v. 110, p. 673-687, 2009.
- HOSHIMOTO, S.; MORISE, Z.; SUZUKI, K.; TANAHASHI, Y.; IKEDA, M.;KAGAWA, T.; MIZOGUCHI, Y.; SUGIOKA, A.J.**HepatobiliaryPancreatSurg.**,v. 16, n. 4, p. 566-70, 2009.
- INAMORI, Y.; MISUMI, A.; MURAKAMI, A.; AKAGI, M. The histogenesis of DMH induced colonic carcinoma in rats. **Gastroenterol. Jpn.**, v. 22, p. 7-17, 1987.
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER.**Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2009.
- IRBY, R.; McCARTHY, S.; YEATMAN, T. Osteopontin regulates multiple functions contributing to human colon cancer development and progression. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 21, p. 515-523, 2004.
- JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R. L. Genética do câncer. In: (Ed.).**Genética médica**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 197-212, 2000
- JOUBERT, F. J.; KRUGER, H.; TOWNSHEND, G. S.; BOTES, D. P. Purification, some properties and the complete primary structures of two protease inhibitors (DE-3 and DE-4) from macrotyloma-axillare seed. **EuropeanJournalofBiochemistry**, v. 97, p. 85-91, 1979.
- JUCÁ, M.; BARROS, B. L. B.; NUNES, P.; MENEZES, H. L.; Gomes, E. G. A.; MATOS, D. Metaloproteinases 1 e 7 e cancercolorretal.**Rev. Bras. Colo-Proctol.**, v. 28, 2008.

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

KENNEDY, A.;BILLINGS, P.; WAN, X.; NEWBERNE, P. Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. **Nutr. Cancer**, v. 43, p. 174-186, 2002.

KENNEDY, A.; DAVIS, J.;CARLTON, W.; WARE, J. Effects of dietary antioxidant supplementation on the development of malignant lymphoma and other neoplastic lesions in mice exposed to proton or iron-ion radiation. **Radiat. Res.**, v. 169, p. 615-625, 2008.

KENNEDY, A. R. Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. **Cancer Res.**,v. 54, p. 1999-2005, 1993.

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

KHAODHIAR, L. BLACKBURN, G.L., Interventions Dietary, **Nutritional Oncology**, v°6, p°786-801, 2006.

KISSELEV, A. F.; CALLARD, A.; GOLDBERG, A. L. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. **The Journal of Biological Chemistry**,v. 281, p. 8582-8590, 2006.

KITAHORI, Y.; CHO, M.; KONISHI, N.; OHSHIMA, M.; MATSUI, E.; OHNISHI, T.; IMAI, S.; HIASA, Y. Overexpression of CD44 variant transcripts in rat transplantable thyroid carcinoma lines demonstrating lung metastasis. **Int. J. Oncol.**,v. 13, p. 505-11, 1998.

KOBLINSKI, J. E., AHRAM, M., AND SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. **ClinChimActa** 291, 113-135, 2000.

KUMAR, P.; SWEERAMA, Y. N.; GOWDA, L. R. Formation of Bowman-Birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichosbiflorus*). **Phytochemistry**, v. 60, p. 581-588, 2002.

KURAGUCHI, M.; COOK, H.; WILLIAMS, E. D.; THOMAS, G. A. Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutations in three strains of mice. **J. Pathol.**, v. 193, p. 517-521, 2001.

LAUFS, S., SCHUMACHER, J., AND ALLGAYER, H. (2006). Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. **CellCycle**5, 1760-1771.

LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage ν T4. **Nature** **227**, 680-681(1970).

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; FERME, A.; LEMOS, R.; PLAPLER, H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cir. Bras.**,v. 13, p. 1998, 1998.

LEVI, E. ; MISRA, S. ; DU, J. ; PATEL, B. ; MAJUMDAR, A. Combination of aging and dimethylhydrazine treatment causes an increase in cancer-stem cell population of rat colonic crypts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 385, p. 430-433, 2009.

LIPKIN, M.; REDDY, B.; NEWMARK, S.; LAMPRECHT, A. Dietary factors in human colorectal cancer. **Annu. Rev. Nutr.**,v. 19, p. 545-586, 1999.

LORIEN, E.; NEWELL, J.; HEDDLE, A. The potent colon carcinogen, 1,2 dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 564, p. 1-7, 2004.

LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk Inhibitor. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,v. 48, p. 94-118, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.**,v. 193, p. 265-275, 1951.

LI, K.; GAO, J.; XIAO, X.; CHEN, L.; ZHANG, L. The enhancing role of vitamin A deficiency on chemically induced nephroblastoma in rats. **J. Pediatr. Surg.**, v. 40, n. 12, p. 1951-6, Dec. 2005.

LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E. A.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E.; LAMB, J.; PECK, D.; SWEET-CORDERO, A.; EBERT, B. L.; MAK, R. H.; FERRANDO, A. A. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, p. 834-838, 2005.

LU, H. OUYANG, W. HUANG, C. ,Inflammation, a key event in cancer development. **Mol Cancer Res** v^o4, 4, 2006.

MAEDA, K.; CHUNG, Y. S.; TAKATSUKA, S.; OGAWA, Y.; SAWADA, T.; YAMASHITA, Y.; ONODA, N.; KATO, Y.; NITTA, A.; ARIMOTO, Y.; *et al.* Tumorangiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 13, p. 477-481, 1995.

MANJU, V.; BALASUBRAMANIYAN, V.; NALINI, N. Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status: the effects of dietary luteolin on 1,2-dimethylhydrazine challenge. *Cell Mol. Biol. Letter*, v. 10, n. 3, p. 535-51, 2005.

MIKAMI, T.; MITOMI, H.; HARA, A. *et al.* **Decreased expression of CD44, alpha-catenin, and deleted colon carcinoma and altered** – a relação da caderina-E com o prognóstico do adenocarcinoma colorretal, 2004.

MORHY, L.; VENTURA, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. **An. Acad. Bras.**, v. 59, p. 71-81, 1987.

MORRIS, C.; MORRIS, L.; KENNEDY, A.; SWEENEY, H. Attenuation of skeletal muscle atrophy via protease inhibition. **J. Appl. Physiol.**, v. 99, p. 1719-1727, 2005.

NAUSS, K. M.; LOCNISKAR, M.; PAVLINA, T.; NEWBERNE, P. M. Morphology and distribution of 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced colon tumors and their relationship to gut-associated lymphoid tissue in the rat. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 73, p. 915-24, 1984.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino acid sequences of trypsin-chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I, and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. **J. of Biochem.**, v. 94, p. 589-599, 1983.

NORIOKA, S.; OMICHI, K.; IKENAKA T. J. Purification and characterization of protease inhibitors from peanuts (*Arachis hypogaea*). **J. Biochem.**, v. 91, p. 1427-1434, 1982.

NYBERG, P.; YLIPALOSAARI, M.; SORSA, T.; ALO, T. Trypsins and their role in carcinoma growth. **Exp. Cell Res.**, v. 312, p. 1219-1228, 2006.

ODANI, S.; KOIDE, T.; ONO, T. Wheat-germ trypsin-inhibitors – Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. **J. of Biochem.**, v. 100, p. 975-983, 1986.

PERŠE, M.; CERAR, A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis. **Radiology and Oncology**, v. 39, n. 1, p. 61-87, 2005.

PIETSCH, E. C.; SYKES, S. M.; MCMAHON, S. B.; MURPHY, M. E. The p53 family and programmed cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6507-21, Oct. 2008.

PONTA, H. SHERMAN, L. HERRLICH, P.A. CD44: From Adhesion molecules to signaling regulators. **Nature Rev. Molecular Cell Biology**. V.4 p.33, 2003.

PUENTE, X. S.; SANCHEZ, L. M.; OVERALL, C. M.; LOPEZ-OTIN, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nat. Rev. Genet.**, v. 4, p. 544-558, 2003.

PRAKASH, B.; MURTHY, M. R. N.; SREERAMA, Y. N.; RAO, D. R.; GOWDA, L. R. Studies on simultaneous inhibition of trypsin and chymotrypsin by horsegram Bowman-Birk inhibitor. **J. Biosci.**, v. 22, p. 545-554, 1997.

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

RECHSTEINER, M.; HILL, C. P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. **Trends in Cell Biology**, v. 15, p. 27-33, 2005.

RHO, J.; QIN, S.; WANG, J. Y.; ROEHL, M. H. A. Proteomic expression analysis of surgical human colorectal cancer tissues: up regulation of PSB7, PRDX1, and SRP9 and hypoxic adaptation in cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 2959-2972, 2008.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 28, p. 425-449, 1990.

ROSENBERG DW, GIARDINA C, TANAKA T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**. 2009;30(2):183-196

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.

SANTANA, MARCOS AURELIO. **Isolamento, Propriedades Bioquímicas e Estudos Biológicos da Lectina de Semente da Macrotyloma axillare**. Ouro Preto: UFOP, 2004.36p.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

SANTOS, A. G. **Estudos farmacocinéticos de Inibidores Bowman-Birk da semente de *Macrotylomaaxillareem* camundongos Swiss**. Ouro Preto: UFOP, 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.

SAMPAIO ALDA R.D., CARLOS E.A. CHAGAS, THOMAS P. ONG, FERNANDO S. MORENO. Vitamin A and b-carotene inhibitory effect during 1,2-dimethylhydrazine induced hepatocarcinogenesis potentiated by 5-azacytidine **Food and Chemical Toxicology** 45 563–567, 2007.

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

STANLEY, B. K. Proteasome inhibition: potential benefits in the treatment of cancer. **EJC Supplements**, v. 2, p. 7-11, 2004.

SUZUKI, K.; YANO, T.; SADZUKA, Y.; SUGIYAMA, T.; SEKI, T.; ASANO, R. Restoration of connexin 43 by Bowman-Birk protease inhibitor in M5076 bearing mice. **Oncol. Rep.**,v. 13, p. 1247-1250, 2005.

TANAKA, K. The proteasome: Overview of structure and functions. **Proc. Jpn. Acad.**,v. 85, p. 12-30, 2009.

TANG, W.; DIAZ, P.; WILSON, K. A.; TAN-WILSON, A. L. Spatial distribution of protein accumulation in soybean seed. **Phytochemistry**, v. 33, p. 1289-1295, 1993.

TROLL, W. Protease inhibitors interfere with the necessary factors of carcinogenesis. **Health Perspect.**,v. 81, p. 59-62, 1989.

USTRELL, V.; HOFFMAN, L.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. PA 200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. **EmboJ.**,v. 21, p. 3516-3525, 2002.

UMESALMA, S.;SUDHANDIRAN, G. Chemomodulation of the antioxidative enzymes and peroxidative damage in the colon of 1,2-dimethyl hydrazine-induced rats by ellagic acid. **Bio.Cell.**,v. 11, n. 3, p. 21-34, 2010.

VOUTSADAKIS, I. A. The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1782, p. 800-808, 2008.

WEIDNER, N., SEMPLE, J. P., WELCH, W. R., AND FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324, 1-8. 1991.

WEINBERG, R. A. Oncogenes and the molecular biology of cancer. *J Cell Biol* 97, 1661-1662, 2008. .

WILKINSON, D. Roles of ubiquitylation in proteolysis and cellular regulations. **Annu. Rev. Nutrition**, v. 15, p. 161-169, 1995.

WILLIAN, B.; AMOSTRONG, A. Single dose administration of BBI in patients with oral leucopakia. **Cancer Epidemiology and Prevention**, v. 9, p. 43-47, 2003.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 82, p. 5395-5399, 1985.

YU, W. H.; WOESSNER, J. F. JR.; McNEISH, J. D.; STAMENKOVIC, I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. **Genes Dev.**, v. 16, p. 307-323, 2002.

ANEXO

1 A

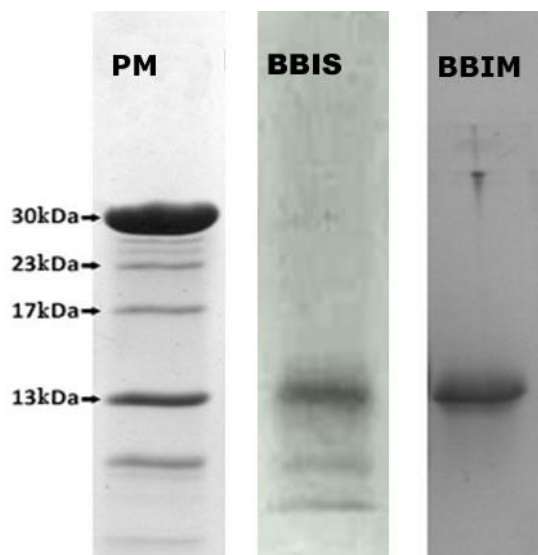


Figura 1A. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 15% SDS-PAGE do BBI utilizado para preparar a razão e a coluna de afinidade de BBI. Linha 1 = Padrão de Massa Molecular (PMM); Linha 2 = BBIS; e Linha 3 = BBIM gel corado por *comassie blue*.