

**FERNANDA SILVA VIEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO  
ANÁLOGO A LUNASINA E DO INIBIDOR BOWMAN-BIRK EM MEMBRANA  
CORIOALANTÓICA DE *GALLUS DOMESTICUS***

**Ouro Preto – MG, março de 2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

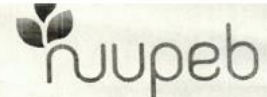
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO  
ANÁLOGO A LUNASINA E DO INIBIDOR BOWMAN-BIRK EM MEMBRANA  
CORIOLANTÓICA DE *GALLUS DOMESTICUS***

AUTOR: Fernanda Silva Vieira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade

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

**Ouro Preto – MG, março de 2014**

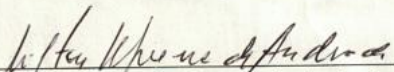



**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**

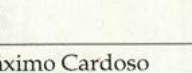
**“Avaliação do potencial antiangiogênico do peptídeo sintético análogo a lunasina e do inibidor Bowman-Birk em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*”**

Aos trinta e um dias de março de 2014, às 14h00min, na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Fernada Silva Vieira**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... APROVAR ..... o candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade  
Presidente

  
Prof. Dr. Mauro César Isoldi  
Examinador (UFOP)

  
Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso  
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 31/03/2014



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil  
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: biotec@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/biotec

V658a      Vieira, Fernanda Silva.  
Avaliação da atividade antiangiogênica do peptídeo sintético análogo a lunasina e do inibidor bowman-birk em membrana corioalantóica de gallus domesticus [manuscrito] / Fernanda Silva Vieira. - 2014.  
53f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Andrade Milton Hércules Guerra de.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.  
Área de Concentração Genômica e Proteômica.

1. Proteínas - Teses. 2. Peptídeos - Teses. 3. Soja - Teses. I. Andrade, Milton Hércules Guerra de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.112.6

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)

*Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Proteômica – ICEB/NUPEB/UFOP, com auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).*

Dedico este trabalho a meus pais, por me fazerem acreditar na realização dos meus sonhos e por terem trabalhado muito para que eu pudesse realizá-los, .  
A você Jaime, companheiro no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou nas horas difíceis e compartilhou comigo as alegrias.

*“Liberdade é pouco. O que eu desejo ainda não tem nome”*

*Clarice Lispector*

## **AGRADECIMENTOS**

À **Deus**, por estar ao meu lado e me dar forças nos momentos mais difíceis dessa minha caminhada. A **Ele** toda a honra e toda a glória!

Ao meu **marido Jaime**, por não me deixar desistir, pela paciência, compreensão, companheirismo e amor.

Aos meus **pais, Imaculada Maria e José Geraldo**, pelo amor e apoio durante minha vida.

Ao meu **irmão Filipe Augusto**, pela amizade e companheirismo.

Ao **Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade**, pela oportunidade.

À toda **equipe do LEP** pela ajuda e pelas risadas.

Aos demais **laboratórios do NUPEB**, pela permissão e ajuda no uso de diversos equipamentos.

À **Universidade Federal de Ouro Preto** por todas as oportunidades oferecidas.

À **CAPES** pelo auxílio financeiro.



## ÍNDICE

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Quadros.....	xiv
<b>I- Introdução.....</b>	<b>2</b>
1. Angiogênese.....	2
1.1. Etapas da Angiogênese.....	4
1.2. Angiogênese no câncer.....	5
1.3. Proteases.....	6
1.3.1. Serino Proteases.....	9
1.4. Inibidores de Proteases.....	10
1.4.1. Inibidores do tipo Bowman Birk.....	10
1.4.1.1. Propriedades fisiológicas do BBI.....	11
1.5. Lunasina.....	13
1.6. Avaliação da atividade angiogênica.....	16
<b>II. Justificativa.....</b>	<b>19</b>
<b>III. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
3. Objetivo geral.....	21
3.1. Objetivos específicos.....	21
<b>IV. Materiais e Métodos.....</b>	<b>23</b>
4.1. Síntese de peptídeos.....	23
4.1.1. Ativação da resina.....	23
4.1.2. Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados.....	24
4.1.3. Clivagem do peptídeo.....	24
4.1.4. Purificação do peptídeo por cromatografia.....	25
4.1.5. Caracterização do peptídeo por espectrometria de massas.....	25
4.2. Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóica de <i>Gallus domesticus</i> .....	25
4.2.1. Quantificação do número de bifurcações dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóica.....	26
4.2.2. Análise estatística do número de bifurcações.....	26
4.3. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
4.4. <i>Western blotting</i> para Conexina 43 e VEGF-D.....	27
4.4.1. Análise estatística.....	28
4.5. Avaliação morfológica microscópica (Histologia).....	29
4.5.1. Coloração.....	29
<b>V. Resultados e Discussão.....</b>	<b>32</b>
5.1. Síntese de peptídeos.....	32
5.1.1. Caracterização por espectrometria de massas.....	33

5.2. Ensaio de modelo angiogênico em membrana corioalantóica de <i>Gallus domesticus</i> .....	34
5.3. Análise histológica das membranas corioalantóicas submetidas ao tratamento.....	38
5.4. Marcadores moleculares.....	39
5.5. Expressão diferencial de proteínas.....	40
<b>VI. Conclusão.....</b>	<b>44</b>
<b>VII. Perspectivas.....</b>	<b>46</b>
<b>VIII. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>48</b>

## RESUMO

A angiogênese ou neovascularização é um processo que inclui a ativação, adesão, proliferação e transmigração de células a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, formando novos vasos. Para que isso ocorra, as células endoteliais devem primeiramente escapar da sua localização estável, através da ruptura da membrana basal, mediada por serino proteases (SPs) e metaloproteases (MPs) e migrar em direção ao estímulo angiogênico. Neste sentido, o equilíbrio entre as proteases e seus inibidores endógenos é necessário para manter a homeostase celular e a angiogênese fisiológica. Os inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk (BBI) são proteínas caracterizadas pela presença de dois domínios independentes, capazes de inibir proteases tripsina-*símile* e quimotripsina-*símile*. Dotado de capacidade antitumoral essa molécula pode atuar inibindo proteases envolvidas na angiogênese. A capacidade do BBI de prevenir a carcinogênese tem sido comprovada, tanto em preparações enriquecidas, o BBI concentrado (BBIC) quanto em preparações purificadas. Entretanto, essa atividade antitumoral pode estar relacionada à presença de outras substâncias em sua preparação. Mais recentemente a Lunasina tem sido apontada como o principal componente responsável por tal atividade. O mecanismo de ação proposto para a Lunasina está relacionado à capacidade de inibição da acetilação de histonas, regulando a desespiralização da cromatina e assim, inibindo a proliferação celular. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antiangiogênico de ambas as substâncias tendo em vista a possibilidade de inibição de enzimas proteolíticas pelo BBI e a atividade antiproliferativa da Lunasina. A avaliação do potencial antiangiogênico foi realizada através do Ensaio em Membrana Corioalantóica (CAM) de *Gallus domesticus*. Para identificar as atividades biológicas dessas proteínas da soja e explorar os possíveis mecanismos relacionados à atividade antiangiogênica, o domínio ativo da Lunasina (PL22) foi sintetizado e testado no ensaio de CAM *in vivo*. Testamos ainda o BBI purificado a partir de sementes de soja e a associação de PL22 e BBI. O peptídeo PL22 e o BBI apresentaram atividade na redução de vasos sanguíneos, a partir da dose de 7000 pmol. A porcentagem de redução do número de bifurcações em relação ao controle foi de 18% para o BBI na dose de 70 pmol e de 31% para o peptídeo PL22 na mesma dose. Entretanto não foi verificado efeito cooperativo ou sinérgico na associação do peptídeo PL22 com o BBI. Não foram observadas variações na expressão dos

marcadores conexina-43 e VEGF pela técnica de Western blotting, sugerindo esses marcadores não estão relacionados ao mecanismo de ação do BBI e PL22. Os resultados da análise corroboram as avaliações feitas pela contagem direta dos vasos em microscópio digital do ponto de vista do efeito antiangiogênico. Além disso, foi observada uma atividade antiinflamatória pra ambas as substâncias. A apreciação dos perfis eletroforéticos bidimensionais de extratos das membranas corioalantóicas tratadas com BBI e PL22 demonstram uma expressão de proteínas diferencial em relação ao controle que permitirá a identificação de possíveis marcadores visando esclarecer o mecanismo e confirmar molecularmente os efeitos constatados.

## ABSTRACT

Angiogenesis or neovascularization is a process, which includes activation, adhesion and transmigration of cells from pre-existing blood vessels, forming new blood vessels. For the process occur, endothelial cells must first escape from their stable location, through disruption of the basement membrane, mediated by serine proteases (SPs) and metalloproteases (MPs) and migrate toward the angiogenic stimulus. Accordingly, the balance between proteases and their endogenous inhibitors is necessary to maintain cellular homeostasis and physiological angiogenesis. Protease inhibitors Bowman- Birk type (BBI) are proteins characterized by the presence of two independent domains capable of inhibiting trypsin-like and chymotrypsin-like proteases. Endowed with antitumor capacity this molecule may act by inhibiting proteases involved in angiogenesis. The ability of BBI to prevent carcinogenesis has proved both in enriched preparations, BBI concentrate (BBIC) and in purified preparations. However, the antitumor activity could be related to the presence of other substances in its preparation. More recently, lunasin was identified as the main component responsible for this activity. The proposed mechanism of action for lunasin was related with the ability to inhibit histone acetylation, regulating the chromatin unfolding and thus inhibiting cell proliferation. This study aimed to evaluate the antiangiogenic potential of both substances in view of the possibility of inhibition of proteolytic enzymes by BBI and antiproliferative activity of lunasin. The assessment of antiangiogenic potential was performed using Chorioallantoic Membrane Assay (CAM) of *Gallus domesticus*. To identify the biological activities of these proteins in soy and explore the possible use in anti- angiogenic therapy, the active area of lunasin (PL22) was synthesized and tested in the CAM assay *in vivo*. BBI also was tested and purified from soybean seeds and the association of PL22 and BBI. The PL22 peptide and BBI showed activity in reducing blood vessels from the dose of 7000 pmol . The percentage of reduction in the number of bifurcations compared to control was 18% for the BBI at a dose of 70 pmol and 31 % for the PL22 peptide at the same dose. However, no cooperative or synergistic effect was observed in association with the peptide PL22 and BBI. No changes in the expression of markers connexin-43 and VEGF by Western blotting was observed, suggesting these markers are not related to the mechanism of action of BBI and PL22. The results of the analysis support the evaluation performed by direct counting of

vessels in digital microscope view of the antiangiogenic effect. In addition, an anti-inflammatory activity for both substances was observed. The assessment of the two-dimensional electrophoretic profiles of extracts of chorioallantoic membranes treated with BBI and PL22 showed a differential expression of proteins compared to control. These experiments represent an approach to identify markers and mechanisms related to the observed effect.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**μL**- Microlitro

**μM**- Micromolar

**ACN**- Acetonitrila

**APs**- Aspártico proteases

**Arg**- Arginina

**BBI**- Inibidores do tipo Bowman-Birk

**BBIC**- Inibidores do tipo Bowman-Birk concentrado

**BHA**- Hidroxianisol butilado

**CAM**- Ensaio da Membrana Corioalantóica

**CEUA**- Comissão de Ética no Uso de Animais

**CPs**- Cisteíno proteases

**Cx-43**- Conexina-43

**DCM**- Diclorometano

**COX-2**- cicloxigenase-2

**DIPC**- Diisopropilcabodiimida

**DMF** - Dimetilformamida

**ELISA**- *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

**FDA**- *Food and Drug Administration*

**Fmoc-9**- Fluorenilmetiloxicarbonila

**HAT**- Enzima histona acetiltransferase

**HE**- Hematoxilina/Eosina

**HIF**- Fator Induzível por Hipóxia

**HPLC**- *High-performance liquid chromatography*

**IL-6**- Interleucina 6

**iNOS**- Oxido nítrico sintase

**Kda**- Kilodaltons

**KTI**- Inibidores do tipo Kunitz

**LCMS-IT-TOF**- *Liquid Chromatography Ion Trap Time of Flight*

**LPS**- Lipopolissacarídeos

**Lys**- Lisina

**m/z**- Razão massa/carga

**mA**- Miliamper

**MAPK-ERK**- *Mitogen-Activated Protein Kinases / Extracellular-signal-regulated kinases*

**mL**- Mililitros

**MPs**- Metaloproteases

**nM**- Nanomolar

**PAR-2**- Receptor ativado por protease 2

**PAs**- Ativadores do plasminogênio

**PCAF**- Histona acetiltransferase PCAF

**PGE2**- prostaglandina-E2

**PL22**- Peptídeo da Lunasina com 22 aminoácidos

**PVDF**- *Polyvinylidene Fluoride*

**SPs**- Serino proteases

**tBoc**- t-Butiloxicarbonila

**TFA**- Ácido trifluoracético

**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral alfa

**TPs**- Treonino proteases

**u.m.a**- Unidade de massa atômica

**VEGF**- Fator de crescimento endotelial vascular

**yGCN5**- Histona acetiltransferase yGCN5



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Esquematização das fases envolvidas no processo angiogênico.....	2
<b>Figura 02:</b> Etapas da angiogênese.....	3
<b>Figura 03:</b> Regulação da atividade da protease.....	7
<b>Figura 04:</b> Estrutura do BBI da soja.....	11
<b>Figura 05:</b> Interação de tripsina com receptor activado por protease 2 (PAR-2) e as metaloproteinases de matriz (MPs).....	12
<b>Figura 06:</b> Sequência de aminoácidos do peptídeo Lunasina.....	13
<b>Figura 07:</b> Internalização Lunasina.....	16
<b>Figura 08:</b> Perfil cromatográfico em sistema HPLC do peptídeo PL22.....	32
<b>Figura 09:</b> Espectro de massa obtido por LCMS-IT-TOF <i>electrosray</i> para o peptídeo PL22 da Lunasina.....	33
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografias de cortes histológicos.....	39
<b>Figura 11:</b> Western blotting.....	40
<b>Figura 12:</b> Géis bidimensionais: A- Controle negativo e B- BBI.....	40
<b>Figura 13:</b> Géis bidimensionais. A-Controle negativo e B- PDL22.....	41

## LISTA DE QUADROS

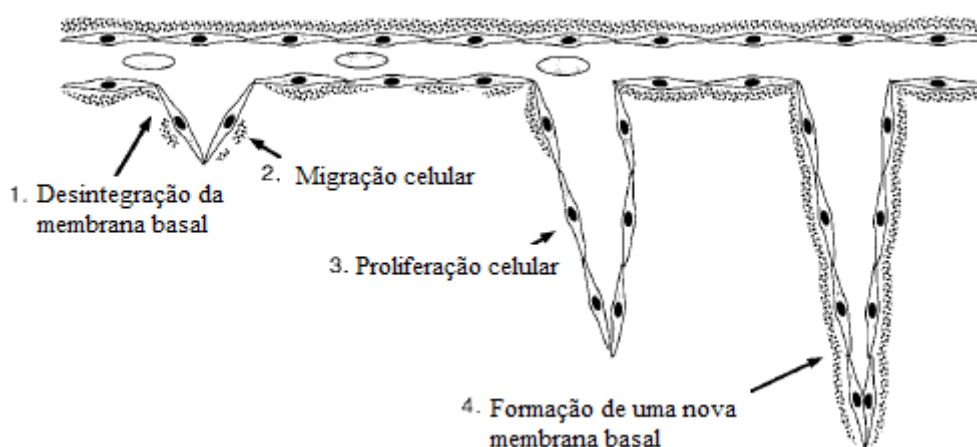
<b>Quadro 01:</b> Substâncias com atividade pró e antiangiogênica.....	4
<b>Quadro 02:</b> Razão entre a densitometria do Controle pelo BBI.....	41
<b>Quadro 03:</b> Razão entre a densitometria do Controle pelo PL22.....	43

## **INTRODUÇÃO**

## I- INTRODUÇÃO

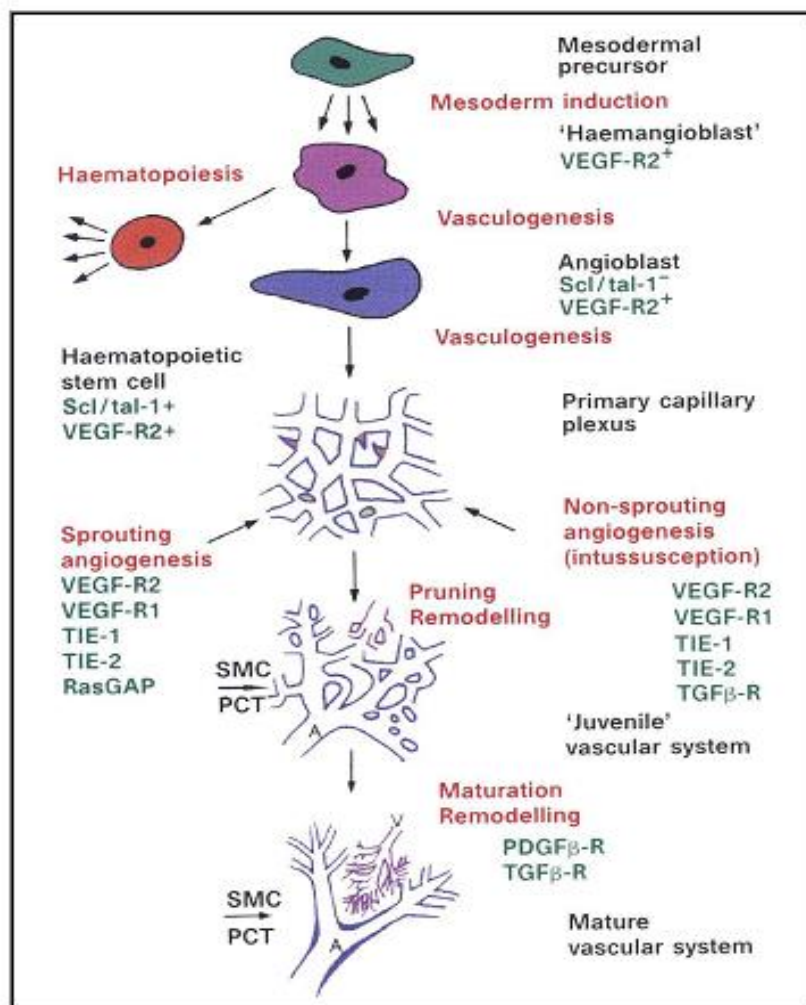
### 1- Angiogênese

O processo de angiogênese ou neovascularização envolve mecanismos complexos que incluem a ativação, adesão, proliferação e transmigração de células endoteliais a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, ocasionando a formação de novos vasos. Tais mecanismos desempenham um importante papel nos processos fisiológicos normais como desenvolvimento embrionário e cicatrização de feridas; bem como em condições patológicas, como no crescimento de tumores sólidos (Jung *et al.*, 2006). Durante o processo, as células endoteliais devem primeiramente escapar da sua localização estável através da ruptura da membrana basal e migrar em direção ao estímulo angiogênico, tal como o que pode ser liberado a partir de células tumorais, linfócitos ativados, ou macrófagos associados a feridas (figura 01) (Carmeliet, 2000).



**Figura 01:** Esquemática das fases envolvidas no processo angiogênico: (1) Desintegração da membrana basal; (2) Migração celular; (3) Proliferação celular; (4) Formação de uma nova membrana basal. Adaptado de Tomanek *and* Schattmen, 2000.

A angiogênese pode ocorrer através de dois mecanismos distintos: brotamento (Risau, 1997) ou intussuscepção (Patan *et al.*, 1996). O mecanismo de brotamento consiste na proliferação das células endoteliais que formam um broto conectado ao vaso de origem. A intussuscepção refere-se ao processo pelo qual um único capilar divide-se longitudinalmente em dois pela formação de um septo (figura 02).



**Figura 02:** Etapas da angiogênese. O esquema mostra os tipos de angiogênese: brotamento, o mais frequente, intussuscepção e pontes trans-endoteliais, e o recrutamento de células progenitoras (EPCs) da medula óssea. Fonte: Risau, 1997.

O desenvolvimento normal dos tecidos e a homeostase do organismo são altamente relacionados à angiogênese. Em condições fisiológicas, este processo é altamente regulado pelo equilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos, atuando sinergicamente para que a neovascularização ocorra de maneira regulada. No adulto, a angiogênese mantém a homeostase fisiológica e a integridade dos tecidos durante a cicatrização de feridas, a inflamação, o crescimento do endométrio no ciclo menstrual e na sequência de isquemia (Negrão *et al.*, 2013).

Por outro lado, pode ocorrer também a angiogênese patológica, onde o desequilíbrio entre os fatores angiogênicos provoca uma multiplicação descontrolada que culmina com a formação de vasos sanguíneos estruturalmente e funcionalmente desordenados (Hasina *and* Lingen, 2001). Esse desequilíbrio é um fator importante em vários processos patológicos, como no crescimento e metástase de tumores, na artrite

reumatóide, retinopatia diabética, obesidade, aterosclerose, isquemia e osteoporose (Hoeben *et al.*, 2004).

### 1.1- Etapas da angiogênese

Durante a proliferação vascular, uma cascata de eventos ocorre de forma coordenada, sequencial e interdependente, através da mediação de diferentes fatores angiogênicos, incluindo fatores de crescimento, quimiocinas, enzimas envolvidas na angiogênese, receptores endoteliais específicos e moléculas de adesão (Tomanek *and* Schattemen, 2000; Bisht *et al.*, 2010). No quadro 1 estão dispostos alguns dos principais fatores e substâncias envolvidas em vias pró e antiangiogênicas.

<b>Angiogenic Factors</b>	<b>Antiangiogenic Factors</b>
Vascular endothelial growth factor	Thrombospondin-1, 2
Acidic and basic fibroblast growth factors	Endostatin
Transforming growth factor- $\alpha/\beta$	Angiostatin
Platelet-derived endothelial cell growth factor	Interferon- $\alpha/\beta$
Hepatocyte growth factor	Interleukin-12
Tumor necrosis factor- $\alpha$	Platelet factor 4 fragment
Epidermal growth factor	Angiopoietin-2
Placental growth factor	Human macrophage metalloelastase
Tissue factor	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1/2
Interleukin-6/8	Vascular endothelial growth inhibitor
Angiogenin	Vasostatin
Angiopoietin-1	Anti-thrombin III fragment
Cyclooxygenase-2	
Nitric oxide	

**Quadro 01:** Substâncias com atividade pró e antiangiogênica. Fonte: Poon *et al.*, 2003.

O principal estímulo iniciador da angiogênese responsável por ativar as células endoteliais é o Fator Induzível por Hipóxia (HIF). Esta proteína pertence a uma classe de fatores de transcrição responsáveis por promover a liberação de fatores angiogênicos, como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) através da ativação das

células endoteliais (Papetti *and* Herman, 2002; Srihari *et al.*, 2013). Após a ativação, as células endoteliais secretam proteases que degradam o tecido extracelular facilitando sua penetração no tecido adjacente (Liekens *et al.*, 2001). Estas proteases podem ser divididas em metaloproteases de matriz (MPs) e ativadoras do plasminogênio (PAs). As MPs são capazes de degradar diversos tipos de proteínas, enquanto as PAs ativam o plasminogênio em plasmina, a qual degrada os componentes da matriz extracelular. Ambas, PAs e MPs são secretadas em conjunto com os seus inibidores, o que assegura um controle rigoroso de sua atividade proteolítica local (Liekens *et al.*, 2001; Kunimasa *et al.*, 2010).

Com a degradação da matriz extracelular ocorre à elevação nos níveis de diversos fatores de crescimento, como VEGF, que estimulam a migração e a proliferação das células endoteliais formando pequenos vasos sanguíneos iniciais. Após o período inicial de migração, há uma rápida proliferação das células endoteliais e inibição da proteólise extracelular ocasionando o crescimento dos vasos recém-formados (Ausprunk *and* Folkman, 1977; Ucuzian *et al.*, 2010).

A maturação da neovasculatura é a etapa final do processo angiogênico, o ordenamento das células endoteliais é estabelecido pelas moléculas de adesão celular formando o lúmen vascular (Tomanek *and* Schattemen, 2000). Após a formação do lúmen vascular, o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas regula o recrutamento de pericitos e células musculares lisas, que estabilizam os vasos recém-formados. Portanto, quando os níveis de vascularização do tecido estabilizam o suprimento sanguíneo local, ocorre a inibição dos fatores angiogênicos secretados através da elevação dos níveis de inibidores no local. Como resultado, as células endoteliais se tornam novamente quiescentes (Tomanek *and* Schattemen, 2000; Bisht *et al.*, 2010).

## 1.2- Angiogênese no câncer

O conceito de que o crescimento de tumores e metástases é dependente do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos foi formulado por Folkman e colaboradores na década de 70 (Folkman, 1990). A insuficiente vasculatura no sítio tumoral cria um ambiente de hipóxia que induz a expressão gênica levando à angiogênese, a qual é responsável pela efusão de oxigênio e nutrientes, e remoção de metabólitos tóxicos das células neoplásicas em proliferação. Além disso, a angiogênese estabelece condições favoráveis para a disseminação metastática, já que à medida que

ocorre a expansão da vascularização, torna-se possível o escape de células tumorais para a circulação (Karamysheva, 2008).

Durante a progressão tumoral, as mudanças ambientais e genéticas induzem uma "troca angiogênica" com uma regulação positiva de fatores angiogênicos ou baixa regulação de inibidores (Poon *et al.*, 2003). Sinais fisiológicos que podem desencadear a angiogênese incluem a hipóxia, alteração no pH, estresse metabólico e citocinas derivadas de resposta inflamatória (Auerbach *et al.*, 2003). Esse fenômeno demarca dois estágios do crescimento tumoral: a fase pré-vascular - relacionada a um crescimento tumoral lento, com pouca ou nenhuma metástase - e a fase vascular, na qual o tumor tem um crescimento rápido e grande potencial metastático, sendo geralmente sintomático e clinicamente detectável (Folkman, 1995).

Nos tumores, o desenvolvimento da angiogênese depende do equilíbrio de fatores angiogênicos e antiangiogênicos. A angiogênese é potencializada por algumas proteínas oncogênicas, tais como Ras e Src e reprimida por certos genes supressores de tumor, como p53 e os genes de von Hippel-Lindau. Assim como ocorre na angiogênese fisiológica, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos no tumor é um processo que compreende várias etapas, iniciando com a liberação de fatores angiogênicos das células tumorais, estes se ligam a receptores específicos nas células endoteliais dos vasos sanguíneos pré-existentes e as ativam, as células endoteliais então liberam enzimas capazes de degradar a membrana basal subjacente. As MPs e PAs são também secretadas pelas células tumorais para dissolver a matriz extracelular. Em seguida, as células endoteliais ativadas proliferam, migram e organizam em novos tubos capilares, seguido pela síntese de uma nova membrana basal e a maturação dos vasos com formação de um lúmen vascular (Poon *et al.*, 2003).

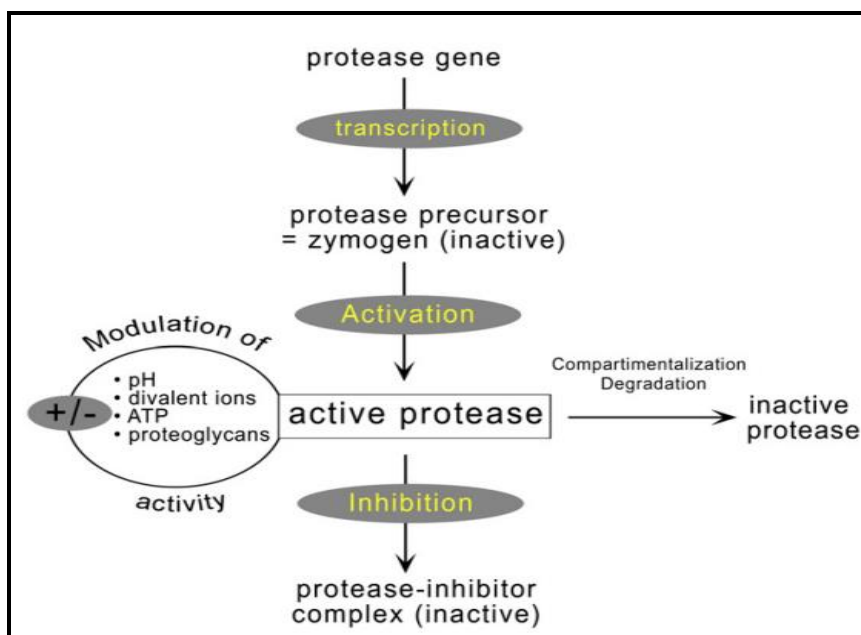
Desse modo, a angiogênese é um alvo potencial para a quimioterapia anti-cancer. Estudos recentes indicam que as proteases participam de praticamente todos os passos do crescimento tumoral, inclusive do processo metastático (Nyberg *et al.*, 2006).

### **1.3- Proteases**

Proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas e representam aproximadamente 2% do total de proteínas celulares, sendo normalmente sintetizadas sob a forma de zimogênio e ativadas por ação de outras proteases ou através de processo autocatalítico (Turk, 2006).



Aproximadamente 1068 proteases e seus homólogos foram identificados no genoma humano até janeiro de 2010. As proteases estão envolvidas em quase todos os processos biológicos dos organismos vivos. No entanto, sua atividade deve ser fortemente regulada para evitar a proteólise excessiva em células e/ou tecidos. Para que isso ocorra, existem vários níveis de controle incluindo a regulação da transcrição gênica, a ativação das pró-formas de protease e inibição de sua atividade proteolítica através de bloqueio direto ou indireto de seus centros ativos por inibidores da proteína (figura 03). Pela alta concentração dos inibidores de proteases em todos os fluidos biológicos acredita-se que está é a forma mais relevante de controle em células e tecidos (Zani *and* Moreau, 2010).



**Figura 03:** Regulação da atividade da protease. As atividades biológicas de proteases são controladas por vários fatores que regulam a sua síntese, ativam e inibem a atividade de seus zimogênios. Eles também podem ser controlados por compartimentalização ou degradação. Outros fatores, tais como o pH e íons específicos são susceptíveis de modular a atividade de proteases no interior das células e tecidos. Fonte: Zani *and* Moreau, 2010.

O equilíbrio entre as proteases e seus inibidores endógenos é o que mantém a homeostase celular, quando esse equilíbrio é alterado em favor das proteases, há uma desregulação das proteólises desencadeando processos de destruição irreversível de tecidos, tais como inflamação, artrites reumatóides, angiogênese patológica e crescimento tumoral ou metástase (Losso, 2008).

As proteases podem ser classificadas de acordo com a posição de clivagem das ligações peptídicas em: exopeptidases - hidrolisam ligações nas extremidades das

cadeias polipeptídicas, como as aminopeptidases que clivam os peptídeos no N-terminal e as carboxipeptidases, que clivam os peptídeos no C-terminal e diferenciam-se pela especificidade de substrato; endopeptidases - que clivam as ligações no interior das cadeias polipeptídicas, que são classificadas de acordo com seu mecanismo catalítico (González-Rábade *et al.*, 2011).

Além disso, elas podem ser classificadas também com base em seu sítio ativo em cinco subclasses: serino proteases (SPs), metaloproteases (MPs), aspárticas proteases (APs), cisteíno proteases (CPs) e treonino proteases (TPs). Esta classificação refere-se os resíduos catalíticos de interação entre a protease e seus inibidores específicos. As SPs estão ligadas a vários processos fisiológicos, como a coagulação sanguínea, respostas do sistema imunológico, apoptose celular e cicatrização tecidual (Safavi *and* Rostami, 2012). Estudos demonstram que pelo menos três famílias de proteases – serino, cisteíno e metaloproteases – estão envolvidas no desenvolvimento tumoral (Powers *et al.*, 2002).

As MPs são uma classe de mais de vinte e três proteases dependentes de cátions bivalentes como o zinco, cobalto ou manganês, sendo o zinco o mais comum para sua atividade. São as proteases que apresentam maior diversidade tanto em termos de estrutura como de função. Dentre as funções encontra-se a participação na destruição da matriz extracelular em condições patológicas como artrite, doenças cardiovasculares, inflamação e o câncer. Existem três classes de MPs: collagenases, estromelinas e gelatinases. Na membrana basal, as MPs são segregadas como zimogênios inativos sendo necessário sua ativação por outras enzimas, a tripsina é um ativador das MPs (Losso, 2008).

As APs possuem dois resíduos de ácido aspártico, responsáveis pela atividade catalítica e uma especificidade preferencial para a clivagem entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. São amplamente distribuídas em plantas, leveduras, nematóides, parasitas, fungos e vírus, possuem uma maior atividade em pH ácido e inibida por pepstatina, um potente inibidor de protease. Também conhecidas como tioproteases, as CPs estão presentes amplamente tanto em procariontes como em eucariotos. Seu mecanismo catalítico envolve um grupo de cisteína no sítio ativo e compreendem uma família de enzimas, constituída por papaína e proteases vegetais relacionados, tais como quimiopapaína, caricaina, bromelina, actinidina, ficina, aleuraina, e o catepsinas B, H, L, S, K (González-Rábade *et al.*, 2011).

### 1.3.1- Serino Proteases

As serino proteases são hidrolases que utilizam o grupo hidroxila do resíduo de serina na posição 195 para clivar ligações amídicas em proteínas e peptídeos (Sergei, *et al.*, 2005). Apesar de o sítio ativo das serino proteases ser sabidamente conservado no que se refere à tríade catalítica (His57, Asp 102, e Ser195), há diferenças de especificidade pelo substrato dentro dessa família (Ishida, 2006). Tais diferenças se devem à natureza dos aminoácidos presentes no sítio catalítico que interagem com os resíduos complementares dos aminoácidos de seus substratos. O acesso do substrato à região catalítica da enzima e a complementaridade estrutural dessas moléculas são pré-requisitos que determinam o processo de proteólise e a eficiência da interação enzima-substrato (Liu *et al.*, 2006).

As SPs constituem um terço de todas as proteases (Gettins, 2002). Suas massas moleculares variam de 19 a 110kDa e sua atividade ótima é alcançada em pH alcalino e a temperatura fisiológica (Antão *and* Malcata, 2005). Dentre as principais enzimas pertencentes a esse grupo encontram-se a tripsina e a quimotripsina (Losso, 2008), ambas sintetizadas e secretadas pelo pâncreas exócrino sob a forma de zimogênios (Walsh *and* Neurath, 1964). Embora apresentem alta similaridade estrutural, essas enzimas reconhecem substratos diferentes. Enquanto a tripsina hidrolisa preferencialmente, as ligações peptídicas no lado carboxila de L-aminoácidos básicos, como a arginina (Arg) e a lisina (Lys), a quimotripsina catalisa a hidrólise de ligações peptídicas após resíduos de leucina (Leu), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr) (Voet *et al.*, 2000).

Assim como as demais proteases, as SPs estão envolvidas em vários processos fisiológicos e possuem atividade regulada por inibidores específicos. Quando ocorre proteólise desregulada causada por desequilíbrio biológico entre as serino proteases e seus inibidores pode haver o desencadeamento de vários processos patológicos, incluindo o câncer (Powers *et al.*, 2002). Estudos demonstram que a expressão e a atividade de serino proteases estão associadas a várias fases de progressão tumoral, incluindo crescimento, invasão e angiogênese (Borgono *et al.*, 2007; Affara *et al.*, 2009).

A tripsina é uma enzima amplamente expressa em células e tecidos tumorais, envolvida na progressão do tumor, além de contribuir para a degradação da matriz extracelular, ativar metaloproteases e modular o comportamento celular através da

ativação de receptores, como receptor de plasminogênio e de fatores de crescimento (Kato *et al.*, 1998; Koshikawa *et al.*, 1998).

#### **1.4- Inibidores de Proteases**

Dentre as proteínas totais da soja, os inibidores de protease representam 6%, sendo os dois principais inibidores o Bowman-Birk (BBI) e o Kunitz (KTI) ambos inibidores de tripsina (Fields *et al.*, 2012). A compreensão do papel das proteases e de seus inibidores quanto à fisiopatologia humana aumenta, e, atualmente os inibidores de proteases apontam como agentes promissores para a prevenção e tratamento de inúmeras doenças. A atividade da maioria das proteases extracelulares é controlada por inibidores naturais específicos, a importância de alguns destes inibidores pode ser observada em casos específicos associados à sua deficiência (Declerck *and* Imren, 1994).

Inibidores de proteases endógenos ou sintéticos exibem elevada afinidade aos sítios catalíticos da enzima, e podem ser classificados em dois grupos: inibidores peptidomiméticos de baixo peso molecular e inibidores proteicos compostos de uma ou mais cadeias peptídicas (Fear *et al.*, 2007). As plantas são boas fontes de inibidores de proteases, que constituem fatores de defesa contra doenças, pragas e defesa contra consumo por herbívoros (Ryan, 1990).

##### **1.4.1- Inibidores do tipo Bowman Birk**

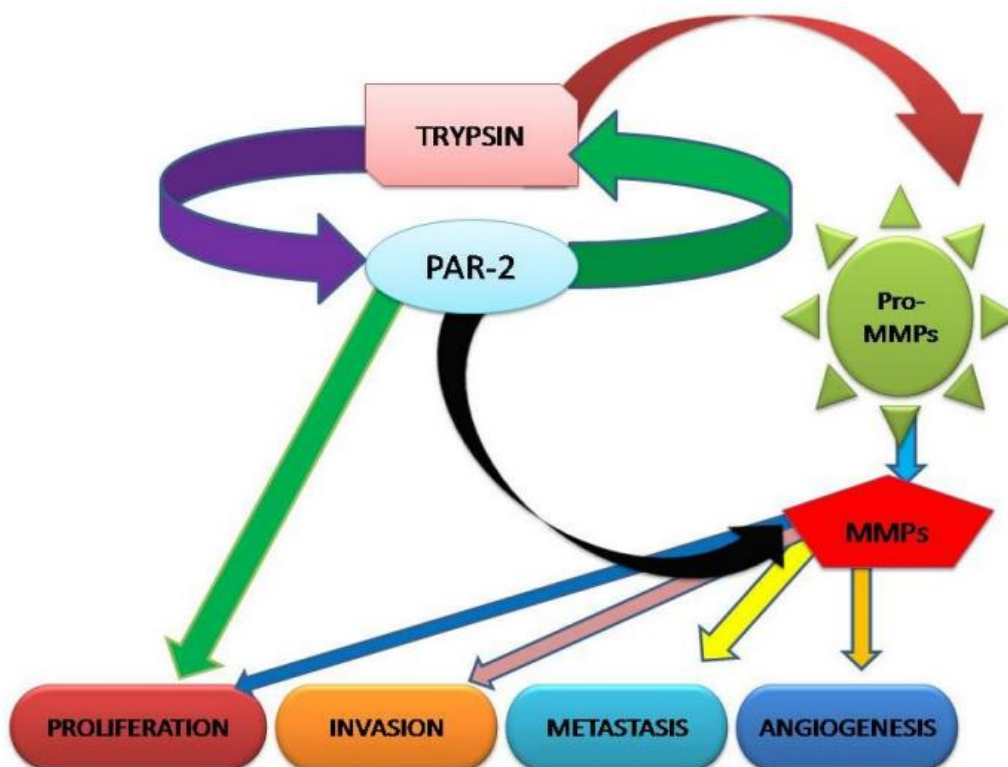
Os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) são inibidores proteicos de serino-proteases isolados pela primeira vez em sementes de soja por Bowman em 1946 e caracterizados por Birk e colaboradores em 1963, sendo posteriormente identificados em outras leguminosas e gramíneas (Clemente *et al.*, 2011).

O BBI é um inibidor com peso molecular de 7,8kDa que possui 71 aminoácidos e 07 ligações dissulfeto o que a torna uma proteína robusta com capacidade de resistir a acidez do sistema digestivo e permanecer estável a 100°C por até 10 minutos, além de permitir a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois sítios reativos independentes que inibem, de forma reversível, as enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina (figura 04) (Deshimaru *et al.*, 2004). Cada sítio reativo é formado por nove resíduos de aminoácidos, e a característica estrutural interessante do BBI é a



parece estar relacionada à presença do sítio reativo inibidor da quimotripsina (Kennedy, 1998b). Estudo de Yavelow e colaboradores 1985, demonstrou que moléculas de BBI modificadas enzimaticamente, com atividade inibitória apenas para a quimotripsina, se mostraram eficazes como supressores de transformação maligna de células induzida por radiação *in vitro*. Outros estudos revelaram que a atividade proteolítica da tripsina correlaciona-se com a agressividade do tumor, pois está ligada à ativação de receptores envolvidos com processos de adesão e proliferação de células tumorais (Miyata *et al.*, 1998).

A tripsina atua na invasão da membrana basal, através da digestão do colágeno tipo I quando é co-expressa e ativa as metaloproteases de matriz (MP-2, MP-7 e MP-9) que são conhecidas por promover a invasão tecidual e metástase. O receptor ativado por protease 2 (PAR-2) pertencente a uma família de receptores acoplado a proteína G também é ativado por essa protease. A tripsina e o PAR-2 agem em conjunto para promover a proliferação, invasão e metástase, o que promove a agressividade do tumor. Estimulados pela tripsina, MPs e PAR-2 podem ativar MAPK-ERK, através da ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (figura 05) (Rakashanda *et al.*, 2012).

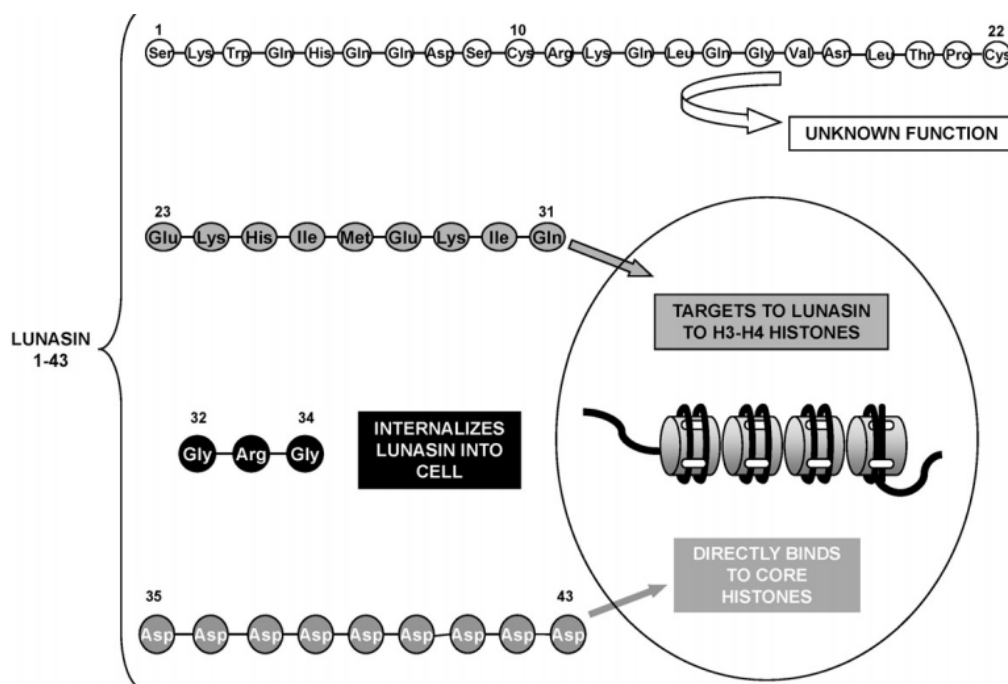


**Figura 05:** Interação de tripsina com receptor activado por protease 2 (PAR-2) e as metaloproteinas de matriz (MPs). Fonte: Rakashanda *et al.*, 2012.

## 1.5- Lunasina

A Lunasina foi originalmente isolada a partir de cotilédones de soja por Galvez e colaboradores 1997. Neste trabalho foi isolado e clonado o cDNA que codifica uma albumina 2S processada pós-traducionalmente (GM2S-1), esta codifica uma proteína rica em metionina, um péptido sinal, péptido de ligação, e uma pequena subunidade denominada Lunasina. Outro trabalho de Galvez e colaboradores em 1999, demonstrou que a transfecção da Lunasina em diferentes células de mamífero ocasionava a interrupção da divisão celular levando a fragmentação cromossômica e apoptose (Hernández-Ledesma *and* Lumen, 2008).

Tal molécula é um péptido de 43 aminoácidos de ocorrência natural dotado de atividade quimiopreventiva, isolada originalmente da soja e posteriormente encontrada em outras espécies de plantas, como a cevada e o trigo. As propriedades biológicas da Lunasina são atribuídas à presença de um motivo de adesão celular (RGD) que se liga a integrinas na matriz extracelular (itálico), aos nove resíduos de ácido aspártico localizados na sua extremidade carboxiterminal (negrito) e uma hélice com homologia estrutural para uma região conservada das proteínas de ligação da cromatina (sublinhado), como observado em sua sequência: KWQHQQDSCRKQKQGVNLT**PC-EKHIMEKIQG**-*RGD*-**DDDDDDDD** (figura 06) (Dia, 2013).



**Figura 06:** Sequência de aminoácidos do peptídeo Lunasina. Fonte: Hernández-Ledesma, Hsieh *and* Lumen, 2009.

O efeito anproliferativo da Lunasina é atribuído à ligação dos resíduos de ácido aspártico de sua extremidade carboxiterminal às regiões hipoacetiladas da cromatina, impedindo sua acetilação, perturbando o controle do ciclo celular. A Lunasina inibe o núcleo de acetilação das histonas H3 e H4, por meio de um mecanismo epigenético no qual a Lunasina é seletivamente nociva às células que estão em transformação ou recém-transformadas perturbando a dinâmica da acetilação e desacetilação das histonas (Jeong *et al.*, 2007). Experimento com Lunasina sintética permitiu avaliar a aderência da Lunasina à cromatina como ligante capaz de impedir a formação eficaz do complexo com o cinetocoro. Desta forma, os microtúbulos não se ligam aos centrômeros, levando à interrupção da mitose e eventualmente à morte celular (Galvez *et al.*, 1999). O papel da sequência RGD esta relacionado com a internalização desse peptídeo nas células, por meio da ligação a receptores de integrina na ligação à matriz extracelular (Hernández-Ledesma, 2011).

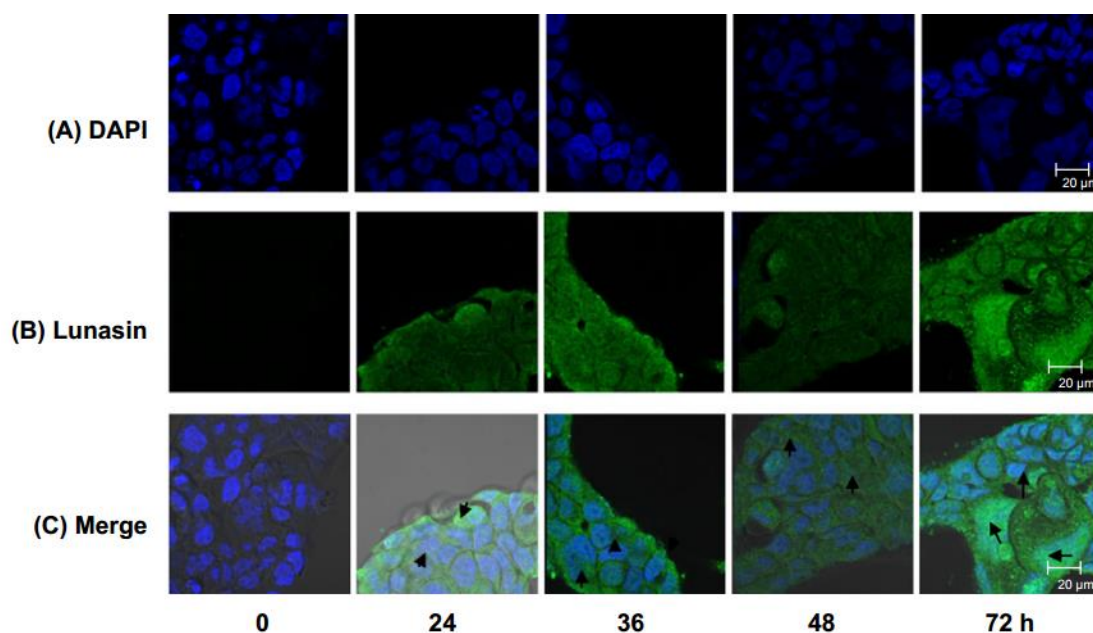
Trabalho desenvolvido por Jeong e colaboradores (2007) avaliou a inibição da acetilação dos núcleos das histonas H3 e H4 pela Lunasina extraída do trigo. Foram realizados experimentos para verificar a inibição das histonas apenas com a Lunasina purificada e também com Lunasina purificada do fígado de ratos alimentados com Lunasina de trigo enriquecida. Para determinar a acetilação das histonas foi realizado o ensaio não radioativo de histona acetiltransferase (HAT), que utilizou yGCN5 uma histona acetiltransferase que acetila H3 e PCAF que acetila H4. Pelo método de ELISA as histonas acetiladas foram detectadas utilizando anticorpo policlonal anti-acetil lisina marcado com peroxidase. O experimento demonstrou que 10nM inibiu 16,2% e 1000nM inibiu 59,1% da acetilação de H3 em comparação com o controle não tratado com Lunasina. Já para H4 houve 17,8% da inibição da acetilação com 10nM de Lunasina e 64% com 1000nM (Jeong *et al.*, 2007).

Hernández-Ledesma e colaboradores (2009) avaliaram as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias da Lunasina utilizando macrófagos da linhagem celular RAW 264.7 em experimento *in vitro* estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) para causar lesão inflamatória, com intuito de estabelecer a relação estrutura versus atividade e efeito em diferentes biomarcadores envolvidos nos processos de oxidação e inflamação. Nesse experimento foram usadas a Lunasina íntegra (sequência completa) e 04 fragmentos: P1-SKWQHQQDSCRKQLQGVNLTPC, P2-DDDDDDDDDD, P3-EKHIMEKIQGR GDDDDDDDDDD e P4-EKHIMEKIQ. Para avaliar a oxidação do ácido linoléico foi utilizado o método de tiocianato de ferro. As amostras testes foram



mantidas a 40 C no escuro por 96 horas, alíquotas foram coletadas nos tempos 5, 24, 48, 72 e 96 horas para medir a atividade antioxidante. Como padrões foram utilizados hidroxianisol butilado (BHA) e  $\alpha$ -tocoferol, ambos antioxidantes. A Lunasina na concentração de 10 $\mu$ M inibiu significativamente a peroxidação lípídica do ácido linoléico em comparação com tecoferol sintético, um potente agente inibidor da oxidação de lípideos. Lunasina nas concentrações de 50 a 100 $\mu$ M foi similar à concentração de 10 $\mu$ M, o que sugere que a inibição da oxidação do ácido linoléico pela Lunasina é dependente da dose, sendo que, os fragmentos P1, P2, P3 e P4 apresentaram uma maior capacidade de inibição em relação à Lunasina íntegra. Foi realizado experimento em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Nas células pré-tratadas com Lunasina houve inibição de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) de maneira dose dependente. Entretanto o pré-tratamento com os fragmentos P1, P2, P3 e P4 e estimuladas com LPS não resultaram em proteção, sugerindo que esses fragmentos isolados não são responsáveis pela atividade anti-inflamatória exercida pela Lunasina.

Com intuito de verificar o processo de internalização da Lunasina, Dia e Mejia (2011) realizaram experimento com células humanas de câncer de cólon KM12L4 tratadas com 1 $\mu$ M de Lunasina nos tempos 24, 36, 48 e 72 horas. Em seguida, fixaram permeabilizaram e trataram as células com anticorpo monoclonal da Lunasina. Por meio de microscopia confocal de imunofluorescência foi verificada a interiorização da Lunasina no tempo de 24 horas e sua translocação para o núcleo após 72 horas (figura 07) (Dia *and* Mejia, 2011).



**Figura 07:** Em (A) as células marcadas com DAPI para núcleo (B) Anticorpo monoclonal de camundongo de Lunasina e marcadas com anticorpo secundário Alexa-Fluor 488 (C) Sobreposição das imagens em A e B. A análise de imagens foram realizadas utilizando LSM 700 microscópio confocal (Zeiss, Alemanha); comprimentos de onda de emissão utilizados foram 405 e 490 nm para DAPI e Lunasina, respectivamente. Fonte: Dia *and* Mejia, 2011.

### 1.6- Avaliação da atividade angiogênica

Ensaios de angiogênese podem utilizar modelos *in vitro* e *in vivo*. Entre esses métodos podemos destacar ensaios de neovascularização da córnea, ensaio *in vivo* e *in vitro* da membrana corioalantóica de galinha (CAM – *corioalantoic membrane assay*), além de ensaios que usam implantes de esponjas para avaliação da angiogênese inflamatória. Os ensaios *in vitro* a proliferação, migração e formação de tubo, realizados em cultura de células e de anel aórtico são preconizados pela literatura (Auerbach *et al.*, 2003).

O ensaio de CAM *in vivo* tem sido amplamente utilizado para estudar angiogênese, devido ao seu baixo custo, facilidade e simplicidade de execução, fácil reprodutibilidade prestando-se como triagem em larga escala (Auerbach *et al.*, 2003).

Para modelo de angiogênese usando moléculas com características antiangiogênicas a principal vantagem do ensaio de CAM é que contém uma rede vascular em desenvolvimento o que facilita a visualização da diminuição do número de vasos. Trata-se de um modelo válido pela literatura para testes acerca da atividade angiogênica de diversas substâncias como esteróides, heparina, anticancerígenos e antagonistas de moléculas de adesão, sendo crescentes os trabalhos publicados nessa

área, além de ser aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Auerbach *et al.*, 2003; Katrancioğlu *et al.*, 2012).

A membrana corioalantóica embrionária de galinha é uma membrana extra-embrionária formada por uma fusão da mesoderme com a ectoderme coriônica, localizada abaixo da membrana da casca, no quarto dia do desenvolvimento embrionário. Apresenta como característica um crescimento progressivo, que inclui a angiogênese microvascular, responsável por atender às exigências de oxigenação do embrião durante seu desenvolvimento, mediante trocas gasosas com o ambiente extraembrionário até o momento da eclosão. Este crescimento da microcirculação é caracterizado pela proliferação de células endoteliais, sendo temporalmente correlacionada com a expressão de Fator de Crescimento de Fibroblastos no fluido corioalantóico. Sua rede capilar é muito espessa e forma uma superfície contínua em contato direto com a casca. Durante o período normal de incubação de 21 dias de embriões de galinha, ocorre um aumento na taxa de angiogênese na membrana durante o décimo dia, quando o índice mitótico então declina rapidamente, e o sistema vascular atinge a sua disposição final ao décimo oitavo dia, antes da eclosão (Missirlis *et al.*, 1990).

A regulação da angiogênese pode ter muitas aplicações clínicas e na pesquisa. Por exemplo, a regulação negativa da angiogênese seria vantajosa durante períodos de crescimento neoplásico e inflamação crônica (Schweigerer *and* Fotsis, 1992); por outro lado, uma regulação positiva seria importante para facilitar o estabelecimento de transplantes e na regeneração tecidual (Arnold *and* West, 1991).

**JUSTIFICATIVA**

## II- JUSTIFICATIVA

A angiogênese é um processo importante em condições fisiológicas e no desenvolvimento de inúmeras patologias. Por isso, pode ser considerada com um alvo potencial na quimioterapia anticâncer e na regeneração tecidual. Sendo assim, o estudo de moléculas com capacidade de inibir este processo representa alternativa para um possível tratamento. Os inibidores de protease do tipo Bowman Birk (BBI) atuam na prevenção do câncer induzido quimicamente e por radiação. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no ano de 2030 haverá 27 milhões de casos de câncer e 17 milhões de mortes por essa doença (Ministério da Saúde, 2011).. Além disso, por ser uma doença de caráter multifatorial, o desenvolvimento do câncer está associado ao desenvolvimento vascular.

A capacidade do BBI de inibir a carcinogênese tem sido extensivamente estudada, tanto em sua forma purificada quanto na forma de extrato proteico de soja enriquecido, denominado BBI concentrado (BBIC). Estudos com o extrato protéico de soja enriquecido demonstraram atividade anticarcinogênica similar ao BBI purificado (Kennedy, 1998b). Dados mais recentes sugerem que essa atividade não se restringe ao BBI podendo ser estendida a outros compostos presentes no extrato enriquecido. Nesse sentido a Lunasina tem sido considerada como um dos principais componentes quimiopreventivos do extrato de soja (Dia, 2013). O efeito antiproliferativo da Lunasina além de promover a supressão de células tumorais pode resultar em inibição do desenvolvimento vascular, colaborando na redução do desenvolvimento tumoral. Por outro lado, a atividade inibitória do BBI sobre serino-proteases relacionadas à ativação do processo angiogênico poderia causar a inibição do desenvolvimento vascular. Essas duas substâncias constituem objetos de estudo como antagonistas da angiogênese (Hernández-Ledesma *and* Lumen, 2008).

Desse modo, tendo como base as atividades dessas proteínas na inibição das proteases da digestão da matriz extracelular e na capacidade antiproliferativa, esse trabalho tem como proposta a avaliação do potencial antiangiogênico, em Ensaio de Membrana Corioalantóica (CAM) de *Gallus domesticus*.

## **OBJETIVOS**

### III. OBJETIVOS

#### 3- Objetivo geral

Avaliar o potencial antiangiogênico do BBI isolado de semente de soja, e, do peptídeo sintético PL22 cuja sequência de aminoácidos é equivalente ao seguimento terminal da Lunasina, em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*.

#### 3.1- Objetivos específicos

1. Sintetizar e purificar o peptídeo PL22 derivado da Lunasina;
2. Avaliar a atividade antiangiogênica do BBI e do peptídeo PL22 em ensaio de membrana corioalantóica *Gallus domesticus*;
3. Avaliar a expressão diferencial de proteínas extraídas da membrana corioalantóica de ovos tratados com BBI e PL22;
4. Avaliar histologicamente as membranas tratadas com BBI e PL22.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**



## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto e catalogado sob o protocolo nº 2013/55.

Para realização dos ensaios, foi utilizado o BBI de soja produzido conforme a metodologia proposta por Yavelow e colaboradores (1985), purificado por cromatografia de troca-iônica em nosso laboratório, e o peptídeo sintético da Lunasina PL22 com 22 resíduos.

### 4.1- Síntese de peptídeos

O peptídeo da Lunasina (PDL) com 22 aminoácidos foi sintetizado manualmente sob a forma solúvel, utilizando-se o protocolo de síntese em fase sólida estabelecido por Merrifield (1965), com algumas modificações. O processo adotado neste trabalho requer a utilização de aminoácidos derivatizados, através da proteção da porção amino com o grupo *Fmoc*. Caso sua cadeia lateral também seja reativa, ela estará igualmente protegida por um grupo que deva responder às exigências de ser adaptado à natureza da cadeia lateral e ser clivado na última etapa da síntese pelo TFA (Ácido trifluoroacético).

A síntese de peptídeos requer um suporte sólido insolúvel para o acoplamento dos aminoácidos. A resina empregada para o acoplamento dos aminoácidos foi a *Rink Amide Resin HL* (Merck, Alemanha) a 0,78 mmol/g, da qual se utilizou a quantidade necessária para um rendimento de 40 µmoles de peptídeo.

#### 4.1.1- Ativação da resina

Antes da ligação do primeiro derivado de aminoácido, 40 µmoles de resina (52 mg) foram colocados em um tubo de síntese ao qual foi adicionada dimetilformamida (DMF) suficiente para cobrir toda a resina, permanecendo sob agitação constante por três horas à 37°C. Para a liberação do seu grupamento *Fmoc*, a resina foi coberta com 3 mL de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF e lavada três vezes, por 20 minutos cada, sob agitação contínua a temperatura de 37°C. Em seguida, a resina foi lavada três vezes alternadamente com metanol e DMF, utilizando-se 2 mL de

cada solvente por lavagem. Todas as lavagens foram realizadas com auxílio de uma bomba de vácuo.

#### 4.1.2- Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados

Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de quatro vezes (160  $\mu$ moles), em relação à quantidade de resina inicial, tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação. Os aminoácidos são ligados pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amino da resina, formando uma ligação peptídica. O primeiro aminoácido foi adicionado ao tubo de síntese em um volume de 2 mL de DMF, acrescido de 25  $\mu$ L de diisopropilcarbodiimida (DIPC) e 23 mg de acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) (*oxyma pure*). O DIPC e a *oxyma pure* são reagentes que permitem a ativação da função carboxílica dos aminoácidos Fmoc. Após 2 horas de agitação à 37°C, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado, sendo então submetida a uma acetilação preventiva. A acetilação impede a continuação do crescimento das cadeias que não reagiram com o aminoácido a ser incorporado, e que, conseqüentemente, se mantêm com o grupo amino-terminal livre. Dessa forma, 50  $\mu$ L de uma solução 1:1 de DIPC e anidrido acético foram adicionados em 1 mL de DMF ao tubo de síntese, permanecendo sob agitação à 37°C por 30 minutos. Ao fim desta etapa, a resina foi lavada três vezes alternadamente com metanol e DMF. A desproteção dos grupos  $\alpha$ -amínicos (remoção do grupo Fmoc), após a incorporação de cada aminoácido, foi realizada lavando-se a resina com 3 mL de uma solução de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF, por três vezes de 10 minutos cada, com agitação contínua à 37°C. Os demais aminoácidos foram processados conforme descrito para o acoplamento do primeiro aminoácido.

#### 4.1.3- Clivagem do peptídeo

Após o término dos ciclos de acoplamento, o último grupamento Fmoc foi eliminado com 4-metilpiperidina 20% em DMF, como descrito previamente, e a resina lavada por quatro vezes, durante cinco minutos, com 3 mL de diclorometano (DCM). A clivagem final, para dissociação do peptídeo da resina, e a desproteção das cadeias laterais foram efetuadas pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com 5 mL de solução de clivagem contendo 95% de TFA. O tubo de reação permaneceu sob agitação

por quatro horas. A solução contendo os peptídeos foi coletada, transferida para tubos de ensaio e os produtos de síntese precipitados com 50 mL de éter etílico, permanecendo em repouso *overnight* à 4°C. Posteriormente, o precipitado foi lavado com éter etílico e centrifugado por três vezes a  $1.500 \times g$  por 5 minutos. Na última etapa, o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspendido em 3 mL de água milli-Q.

#### 4.1.4- Purificação do peptídeo por cromatografia

O peptídeo sintetizado em fase sólida foi submetido à cromatografia de fase reversa para a análise de sua pureza. A cromatografia foi realizada em coluna C18 (250 mm x 10 mm; Lichrocart 250-10 Purospher-Shimadzu<sup>®</sup>), em sistema HPLC Shimadzu<sup>®</sup>. A coluna foi previamente equilibrada com uma solução de água mili-Q e TFA 0,1%. Uma alíquota do peptídeo (20 µL) foi eluída em um gradiente de acetonitrila (ACN) variando de 25 a 60% em TFA 0,1% durante 90 minutos com uma vazão de 1 mL/minuto, monitorando-se a eluição a 280 nm.

#### 4.1.5- Caracterização do peptídeo por espectrometria de massas

O peptídeo purificado foi analisado por espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF (*Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight*), que opera por ionização do tipo *electrospray* (Shimadzu<sup>®</sup>). O equipamento foi calibrado utilizando trifluoroacetato de sódio. A voltagem capilar foi de 4500 V no modo positivo de ionização, com tempo de acumulação de 10 ms. As amostras foram aplicadas através de injeções diretas de alíquotas de 5 µL.

#### 4.2- Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*

A atividade angiogênica do peptídeo foi avaliada através do ensaio da membrana corioalantóica de galinha (CAM), descrito por Auerbach e colaboradores em 1974.

Ovos de galinha embrionados foram obtidos da granja José e Maria de Cachoeira do Campo, Ouro Preto, os mesmos tiveram sua superfície higienizada com auxílio de uma esponja seca para remoção de quaisquer dejetos presentes. Os ovos foram incubados em chocadeira Brasmatic<sup>®</sup> à 37°C, com 60% de umidade e viragem

automática dos ovos a cada quinze minutos. No oitavo dia de incubação foi aberto um orifício na região inferior do ovo (região correspondente ao saco aéreo) com o auxílio de agulha estéril. Neste local foram instilados 7  $\mu$ L da substância a ser testada, por um período de cinco dias consecutivos. No 14º dia de incubação os embriões foram anestesiados utilizando uma associação de xilasina/quetamina (1:1) e posteriormente sacrificados por seccionamento cervical. As membranas corioalantóicas foram removidas e fotografadas em microscópio digital (Vimicro corp®).

#### **4.2.1- Quantificação do número de bifurcações dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóica**

Após o registro das imagens, as mesmas foram analisadas com auxílio do *software* Adobe Photoshop®, sendo divididas em quadrantes de 0,5 cm<sup>2</sup>. Foram escolhidos aleatoriamente 10 quadrantes (representando aproximadamente 10% da área total da imagem) e as bifurcações dos vasos sanguíneos foram quantificadas.

De forma a tornar a contagem mais reprodutível optou-se por critérios de exclusão para os quadrantes a serem selecionados, a saber: ausência de preenchimento ou preenchimento parcial do quadrante, artefatos na imagem que impedissem a contagem dos vasos ou a presença de vasos calibrosos (com calibre igual ou superior a 3 mm), facilitando a seleção dos campos a serem analisados. Em cada um dos campos selecionados realizou-se a contagem do número de bifurcações dos vasos sanguíneos.

#### **4.2.2- Análise estatística da quantificação do número de bifurcações**

As análises estatísticas realizadas com o *software* GrafPad Prism 5.0® tiveram seus dados analisados considerando os valores relativos obtidos pela razão  $\frac{\text{teste}}{\text{média do controle negativo}}$  para o número de bifurcações de vasos sanguíneos presentes em cada quadrante das membranas corioalantóicas de *Gallus domesticus* analisadas. Posteriormente, realizou-se o teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns para a comparação entre os valores obtidos para cada grupo teste, adotando um nível de significância  $p \leq 0,05$  para todas as análises.

### 4.3- Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Aproximadamente 10 µg de proteínas totais para a fração de membrana e 30 µg para a fração citosólica, por fração enriquecida conforme descrito anteriormente, tiveram sua análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo o método descrito por Laemmli em 1970. Foram confeccionados géis de separação a 12% e géis de concentração a 5% em condições desnaturantes, adotando-se a amperagem de 20 mA por gel. As amostras diluídas (1:1) em tampão da amostra (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,002%) foram submetidas a banho de água fervente por 5 minutos para garantir a desnaturação das proteínas. Para se determinar o peso molecular das bandas do gel utilizou-se o padrão o *Molecular Weight Marker Kit* (Sigma Aldrich®, EUA). Sendo o gel corado com Coomassie Blue G-250 0,025% em 40% de etanol e 7% de ácido acético, após a corrida em tampão Tris-HCl (25mM, glicina 0,19 M e SDS 0,1%).

### 4.4- Western Blotting para Conexina-43 e VEGF-D

A técnica de *Western Blotting* (Towbin *et al.*, 1979) permitiu a detecção dos níveis de concentração de conexina-43 (Cx-43) e do VEGF-D nas frações de membrana e citosólica, respectivamente, purificadas a partir das membranas corioalantóicas. Transferiu-se os géis de poliacrilamida confeccionados como descrito anteriormente, para uma membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) (Invitrogen®) a 200 mA, por duas horas, sob refrigeração em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20% e SDS 0,02%.

Concretizada a transferência, ocorreu o bloqueio das membranas *over night* em tampão de bloqueio (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tween-20 0,3% e leite em pó desnatado 5%). Em sequência, procedeu-se à lavagem das membranas realizada com tampão TBST (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl e 0.1% de Tween-20 (Sigma®)), por três vezes, o que proporcionou a remoção deste tampão inicial. Após a lavagem das membranas, estas foram incubadas em tampão *immunoblotting* (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Tween-20 0,013% e em leite em pó desnatado 5%) por 30 minutos, sob agitação constante e antes da adição dos anticorpos primários.

Para os testes utilizando as frações citosólicas aplicou-se o soro contendo anticorpos policlonais anti-VEGF-D, na diluição 1:500. Este anticorpo foi produzido

pelo nosso grupo de pesquisa. Para isso, o epítopo a serem sintetizado na produção de anticorpos policlonais para VEGF-D foi selecionado após o confronto entre as sequências proteicas de *Mus musculus* e *Gallus gallus*, utilizando como ferramenta o BLASTp (disponível pela NCBI em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). A sequência do *Gallus gallus* foi utilizada por este ser o parente mais próximo do *Gallus domesticus* com sequência depositada no NCBI. As análises permitiram a identificação apenas da sequência do precursor de VEGF-D, entre a família de VEGF's, com epítomos possuindo alterações suficientes para a imunização em camundongos. O epítopo SNTQRHQYT do VEGF-D foi selecionado para síntese e posterior produção de anticorpos policlonais. Para os testes utilizando a fração de membrana foi utilizado o anticorpo monoclonal Cx43 na diluição 1:4000 (Sigma Aldrich®, EUA). Esses foram adicionados ao tampão de *immunoblotting*, a membrana permaneceu sob agitação constante, durante 3 horas, à temperatura ambiente para reação entre os anticorpos e as proteínas específicas presentes na membrana, realizando-se posteriormente uma nova etapa de lavagens com tampão TBST.

Após as lavagens, realizou-se nova incubação da membrana, por 30 minutos, sob agitação constante, com tampão de *immunoblotting*, sendo, ao fim deste período, adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado com fosfatase alcalina (1:2000) (Sigma Aldrich®, EUA) para as frações citosólicas e anti-IgG de coelho para as frações de membrana, permanecendo sob agitação constante, durante 2 horas.

Antes da revelação das membranas, estas foram lavadas com tampão TBST por três vezes e uma vez com Tris-HCl 10 mM pH 9,0, tendo sua revelação com o uso da solução de NBT/BCIP (*Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato*) (Sigma Aldrich®, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 4.4.1- Análise estatística

Posteriormente às análises densitométricas das membranas de PVDF com o *software Quantity One* (Bio-Rad®) versão 4.6.9. Utilizou-se o *software GrafPad Prism 5.0*® após a obtenção dos dados relativos obtidos pela razão  $\frac{\text{teste}}{\text{Controle negativo}}$  para os níveis de concentração de Conexina 43 e VEGF-D nas membranas corioalantóicas de

*Gallus gallus*. Em seguida, realizou-se o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Turkey para a comparação entre os valores obtidos para cada grupo adotando-se um nível de significância  $p \leq 0,05$  para todas as análises.

#### **4.5- Avaliação Morfológica Microscópica (Histologia)**

Para realizar as análises histológicas as membranas foram fixadas em formol tamponado 10%, foi necessário envolver as membranas em papel filtro entre lâminas durante duas semanas. Posteriormente, foram processadas e incluídas em blocos de parafina e, então foram realizadas secções em micrótomo de 4,0  $\mu\text{m}$ .

##### **4.5.1- Coloração**

As membranas foram coradas por Hematoxilina/Eosina (HE). Antes de iniciar as etapas da coloração os corantes foram filtrados. Primeiramente, foram realizadas duas etapas com xilol por 15 minutos, seguidos de etapas de hidratação na seguinte ordem: álcool absoluto - 5 minutos, álcool 90° - 3 minutos, álcool 80° - 3 minutos, álcool 70° - 3 minutos. Em seguida há uma etapa de lavagem por 5 minutos em água corrente e, em seguida iniciam-se as etapas de coloração, primeiro com hematoxilina por 40 segundos, depois etapa de lavagem em água corrente, e em seguida eosina por 40 segundos e lavagem em água corrente. Posteriormente foram realizados etapas de desidratação na seguinte ordem: álcool 70°, álcool 80°, álcool 90°, álcool absoluto I, álcool absoluto II três mergulhos cada um. Seguindo de duas etapas xilol por 10 minutos cada. Por fim as membranas foram secas em estufa a 58°C por 15 minutos e montadas em *Entellan*<sup>®</sup> sintético. Avaliaram-se qualitativamente os seguintes parâmetros: presença de células inflamatórias e de defesa.

#### **4.6-Eletroforese Bidimensional (2D SDS-PAGE)**

Para a confecção de géis bidimensionais, solubilizaram-se aproximadamente 30  $\mu\text{g}$  de proteína em tampão de rehidratação contendo Dithiotreitol (DTT) 1% e Anfólitos pH 3-10 0,8%. Acondicionou-se as amostras em sarcófagos de porcelana (Strip Holder 7 cm, GE Healthcare<sup>®</sup>) para incorporação e isoeletrofocalização das proteínas no gel de primeira dimensão (Immobiline DryStrip Gels 7 cm pH 3-10 linear,

GE Healthcare®). Após a focalização isoelétrica, as proteínas presentes nos géis de primeira dimensão foram submetidas à redução com DTT 1% em Solução de Equilíbrio (Uréia 6 M, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 1%) e, em seguida, alquiladas com Iodoacetamida (IAA) 4% em Solução de Equilíbrio.

A separação de proteínas por massa molecular (Segunda Dimensão - 2D SDS-PAGE) foi realizada em gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese foi conduzida a 50 V/gel nos primeiros 10 minutos e, posteriormente a 100 V/gel por aproximadamente 2 horas. Para a coloração, utilizou-se solução de Coomassie Brilliant Blue G250 Coloidal, que dispensa a etapa de descoloração por não apresentar background. Obteve-se as imagens através do scanner ImageScanner III (GE Healthcare®) e analisou-se as diferenças entre os *spots* obtidos através de sobreposição de imagens realizada pelo software 2-D Evolution, versão 2005 (GE Healthcare®).



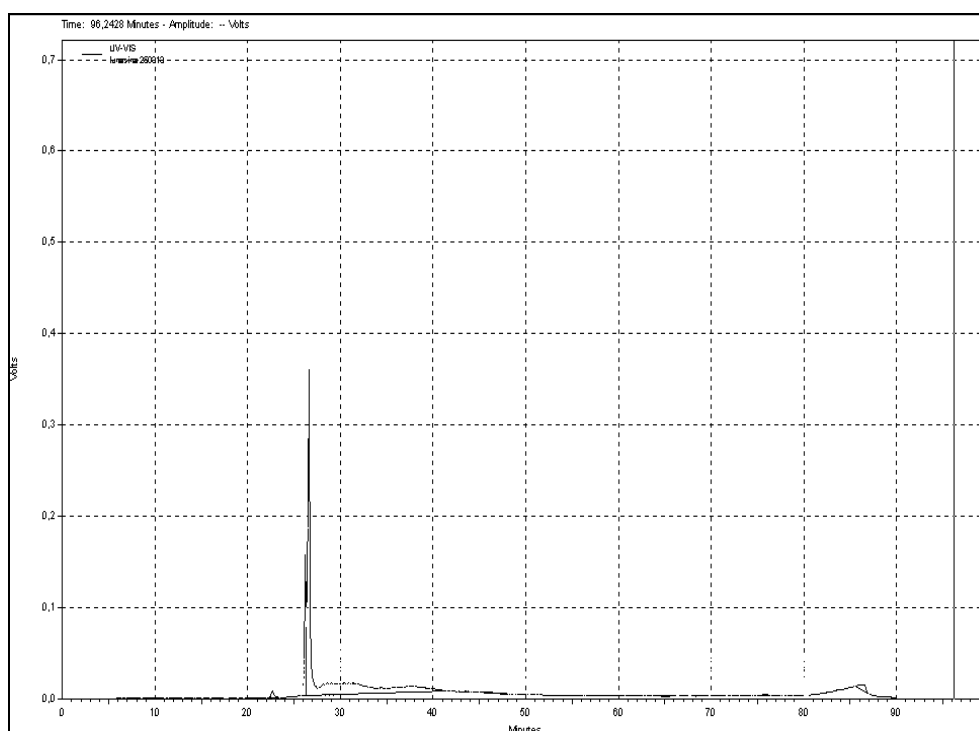
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## V- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Síntese de peptídeo

Como apresentado no item 1.4, a sequência YEKHIMEKIQG-RGD-DDDDDDDD- (PL22) foi escolhida por conter a estrutura mínima com regiões que apresentam atividade biológica da Lunasina de soja (Dia, 2013). A região C-terminal composta de 09 resíduos de ácido aspártico é apontada como essencial para atividade antiproliferativa, a sequência RGD na internalização e o restante da sequência apresenta homologia com proteínas de ligação à cromatina (Galvez *et al.*, 1999; Hernández-Ledesma, 2011).

O peptídeo foi sintetizado manualmente em fase sólida segundo protocolo de Merrifield, (1965). Após a síntese, o peptídeo foi submetido à purificação em fase reversa em sistema HPLC para a análise de pureza. O perfil cromatográfico obtido é consistente com o grau de pureza do material gerando o perfil cromatográfico apresentado na figura 08.



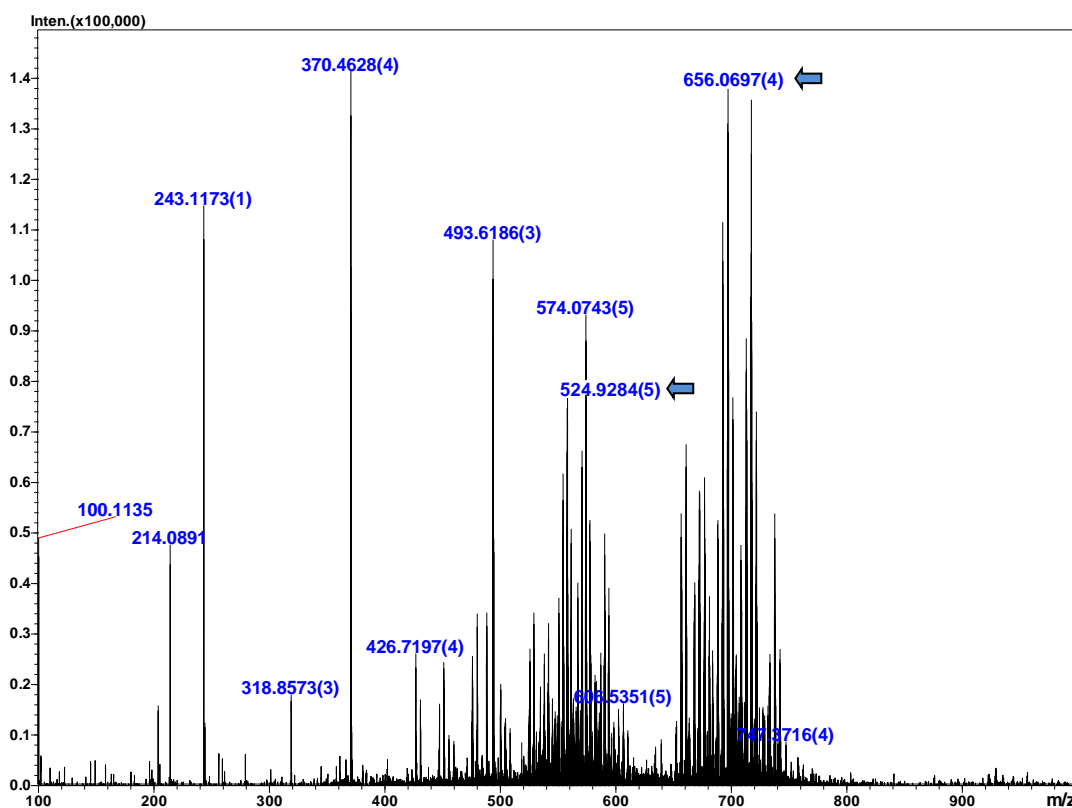
**Figura 08:** Perfil cromatográfico em sistema HPLC do peptídeo PL22 analisado em gradiente de acetonitrila com TFA 0,1% de 20 a 60% em 60 minutos com fluxo de 1 mL/min (fase estacionária: coluna C18 - 250 mm x 4,6mm - Shim-pack CLD-ODS e coluna preparativa C18-250 mm x10 mm LiChocART®).

Conforme observado na figura 08, pela análise do perfil cromatográfico o produto da síntese possui um componente principal, demonstrando o sucesso do procedimento. Desta forma o peptídeo de 22 resíduos de aminoácidos apresentou elevado grau de pureza após sua purificação.

### 5.1.1- Caracterização do PL22 por espectrometria de massas

A fração correspondente ao pico principal recolhida na cromatografia de fase reversa foi analisada por espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray* (Shimadzu®). Esta amostra apresentou massa molecular condizente com a predita pela ferramenta *ExPASy – Compute PI/Mw tool*, (PL22: 2624,64 u.m.a.) confirmando a identidade estrutural.

A figura 09 apresenta o espectro de massa obtido do peptídeo PL22 com os picos correspondentes a relação massa/carga destacado pelas setas azuis (656.0697 com carga +4 e o pico 524.9284 com carga +5).

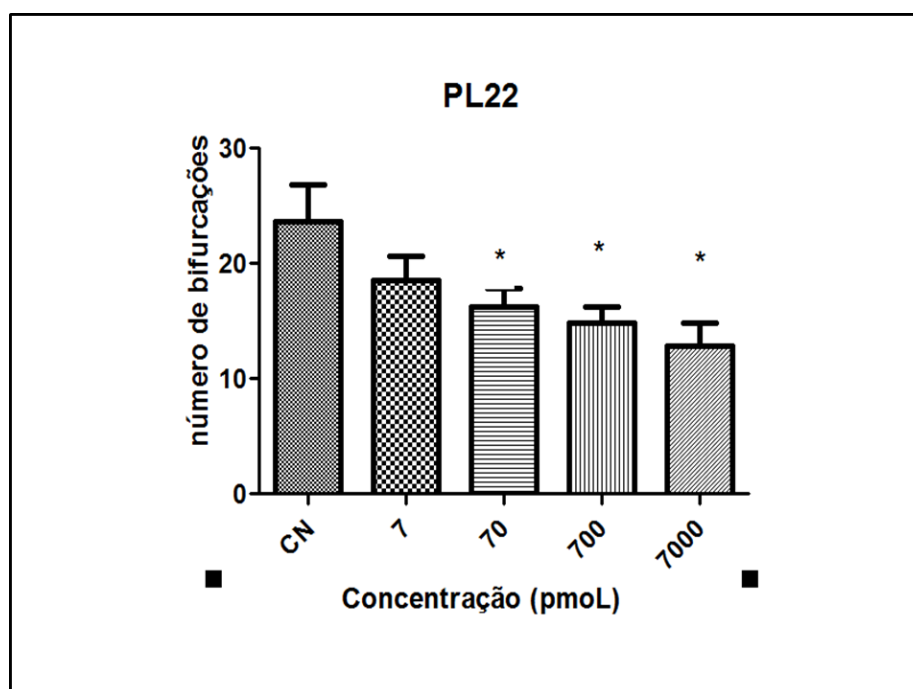


**Figura 09:** Espectro de massa obtido por LCMS-IT-TOF *electrospray* para o peptídeo PL22 da Lunasina. Relação massa /carga esperada 2624,64 u.m.a.

## 5.2- Ensaio de modelo angiogênico em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*

Com o intuito de avaliar o potencial antiangiogênico do peptídeo sintetizado foi realizado ensaio biológico pela aplicação tópica de doses crescentes durante cinco dias consecutivos em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*. Além disso, o BBI foi avaliado nesse mesmo modelo e em associação com PL22.

O gráfico 01 apresenta os resultados obtidos na exposição tópica em membrana corioalantóica de doses de PL22 entre 7 e 7000 pmols. Foram encontrados decréscimos da angiogênese de forma consistente com a dose, a partir da dose de 70 pmol com diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). A redução máxima observada foi de 46%.



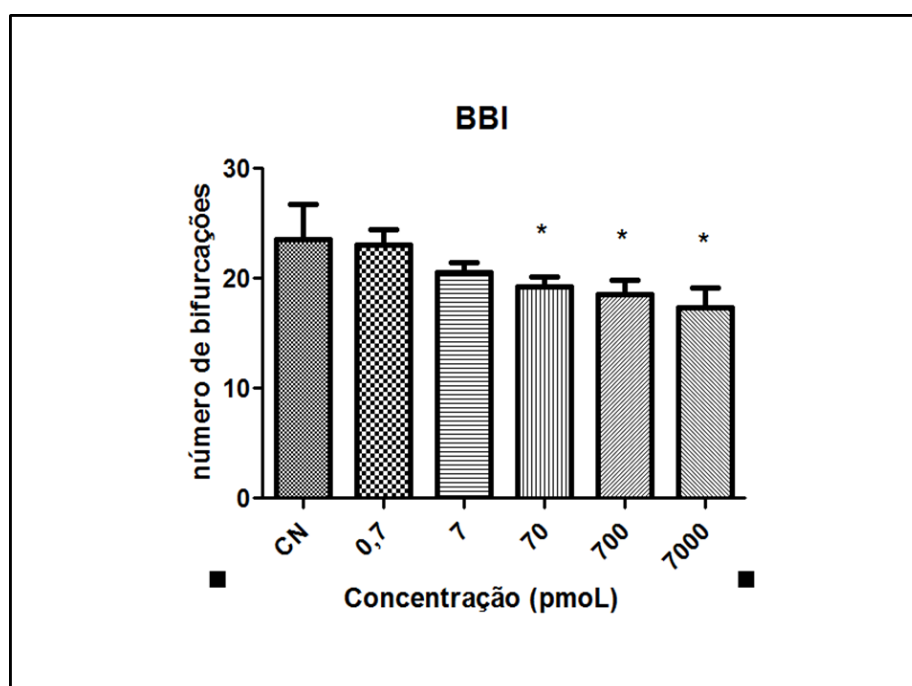
**Gráfico 01:** Atividade antiangiogênico do peptídeo PL22 nas doses de 7, 70, 700 e 7000 pmol. \* diferença estatística encontrada em relação ao controle, n = 8.

Grande parte dos estudos realizados com Lunasina utilizam preparações enriquecidas a partir de extratos de soja, fracionadas em cromatografia de troca-iônica (Dia *et al*, 2009; Dia *and* Mejia, 2010). Essas preparações podem conter contaminantes de componentes da soja e BBI, que podem comprometer os resultados obtidos para Lunasina. Alguns trabalhos atribuem mérito a Lunasina em estudos que foram realizados com BBI pelo fato das preparações de BBI, obtidas de forma convencional, conterem até 50% de Lunasina quantificada por ELISA (Hsieh *et al.*, 2010). Portanto, é

imprecindível que essas substâncias sejam avaliadas isoladamente nas suas atividades biológicas. Nesse sentido, os resultados obtidos neste trabalho não são passíveis dessas críticas uma vez que, o peptídeo análogo a Lunasina PL22 empregado em nossos estudos foi obtido pela síntese em fase sólida.

O aumento da atividade antiangiogênica com o aumento da dose é coerente com a resposta biológica típica decorrente de interação molecular. Tendo em vista, que os efeitos foram notados a partir da dose aplicada topicamente de 70 pmol que será distribuída pelo volume do ovo, pode-se concluir que essa substância apresenta uma atividade antiangiogênica significativa.

O gráfico 02 apresenta os resultados obtidos na exposição tópica em membrana corioalantóica às doses de BBI entre 7 e 7000 pmol. Foram encontrados decréscimos da angiogênese de forma consistentes com a dose, a partir da dose de 70 pmol com diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). A redução máxima observada foi de 26%. A análise desses resultados demonstra que o PL22 foi mais efetivo na inibição da angiogênese.



**Gráfico 02:** Atividade antiangiogênica do inibidor BBI nas concentrações de 7, 70, 700 e 7000 pmol.\* diferença estatística encontrada em relação ao controle, n = 8.

Considerando que os efeitos foram observados a partir da dose 70 pmol, pode-se concluir que essa preparação de BBI também apresenta uma elevada atividade antiangiogênica. O BBI utilizado nesse trabalho foi purificado a partir de uma fração enriquecida pela precipitação etanólica do extrato de soja por meio de cromatografia de

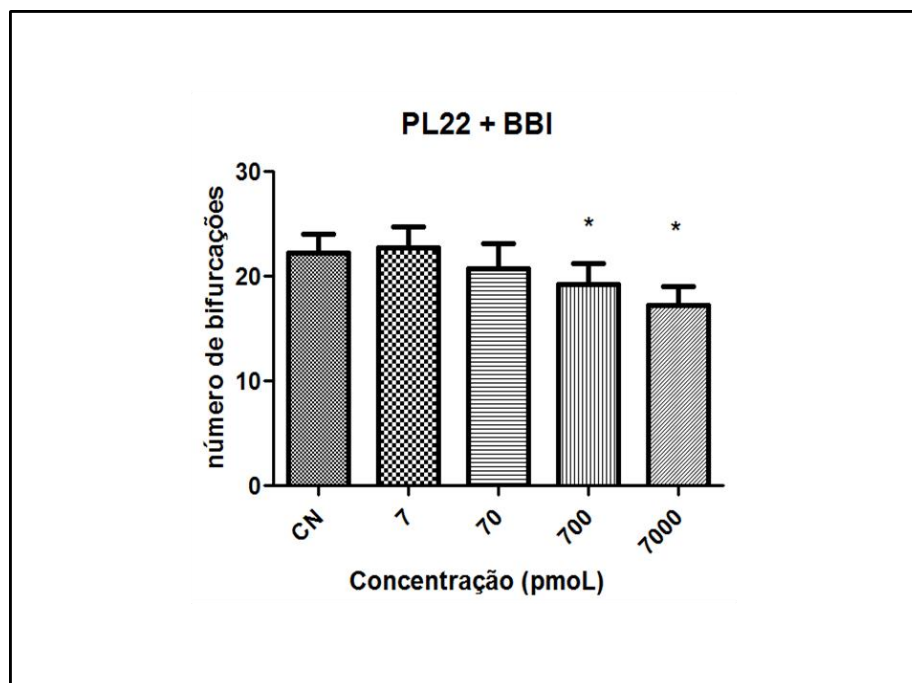
troca-iônica. Apesar da presença de pequenas proporções de Lunasina ser questionada na purificação do BBI. Experimentos de CAM realizados com peptídeos sintéticos correspondentes aos domínios inibitórios do BBI, obtidos no Laboratório de Enzimologia e Proteômica da UFOP, apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho. Dessa maneira, acredita-se que as respostas encontradas sejam realmente decorrentes da interação BBI – células da membrana corioalantóica.

O BBI apresentou uma atividade ligeiramente reduzida em relação ao PL22, de forma significativa, em todas as doses. A quantificação do número de bifurcações de vasos em relação ao controle mostra um decréscimo de 18%, 22% e 26% para o BBI nas doses de 70, 700 e 7000 pmol, respectivamente e, de 31%, 37% e 46% para o peptídeo PL22 nas mesmas condições.

Embora as substâncias PL22 e BBI tenham sido avaliadas neste trabalho do ponto de vista do seu potencial antiangiogênico, essas possivelmente possuem mecanismos distintos de ação. Enquanto, o BBI possivelmente atue mediante a inibição de enzimas ativadoras de proteases que degradam a matriz extracelular, a Lunasina possivelmente inibe a proliferação celular através da inibição da acetilação de histonas. O objetivo deste estudo visa avaliar de forma isolada a atividade dessas duas substâncias que podem estar relacionadas à atividade do extrato de soja na prevenção do câncer. Por outro lado, as duas substâncias foram testadas em associação nas mesmas doses dos ensaios anteriores visando uma avaliação de possíveis efeitos sinérgicos a semelhança do que se espera encontrar no extrato de soja.

O gráfico 03 apresenta os resultados obtidos na exposição tópica em membrana corioalantóica às doses de PL22 associado ao BBI entre 7 e 7000 pmol. Foram encontrados decréscimos da angiogênese de forma consistentes com a dose, a partir da dose de 700 pmol com diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). A análise desses resultados demonstra que apesar de ambas as substâncias apresentarem efeitos inibitórios na angiogênese e o PL22 ser mais efetivo, a associação de BBI e PL22 reduz a atividade antiangiogênica. A quantificação do número de bifurcações de vasos em relação ao controle mostra uma redução de 19% na dose de 700 pmol e 28% para a dose de 7000 pmol. Análise dos resultados, apesar do decréscimo obtido para concentração de 70 pmol não apresentar diferença significativa em relação ao controle, mostra uma semelhança com a atividade encontrada para o ensaio realizado apenas com o BBI. Esses dados demonstram uma ausência de efeitos somatórios entre BBI e PL22 e sugere que a presença do BBI possa suprimir a atividade da Lunasina. Esses resultados

sugerem que a presença dessas duas substâncias no extrato de soja possa ao contrário do que se esperava prejudicar o efeito final. Entretanto, estudos mais detalhados nesse sentido deverão ser conduzidos para avaliar essa hipótese.



**Gráfico 03:** Atividade antiangiogênica do peptídeo PL22 associado ao BBI nas concentrações de 7, 70 700 e 7000 pmol. \* diferença estatística encontrada em relação ao controle, n = 8.

O mecanismo de ação do BBI pode ser mais complexo: embora a inibição da ativação de proteases que degradam a matriz extracelular possam claramente explicar sua atividade antiangiogênica, trabalhos da literatura relatam que o BBI inibe o proteassoma (Carli *et al.*, 2012), e relacionam essa atividade com sua resposta antitumoral (Saito *et al.*, 2007). Por outro lado, alguns trabalhos relacionam inibição alósterica do proteassoma com a atividade angiogênica. Essa atividade é explicada pela inibição da degradação seletiva pelo fator HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$* ) (Li *et al.*, 2000; Gallo *et al.*, 1994). Peptídeos ricos em prolina e arginina derivados do PR-39 secretado em bordas de feridas são inibidores do proteassoma e dotados de atividade angiogênica responsável pela reparação tecidual (Gallo *et al.*, 1994; Bao *et al.*, 2001). De forma aparentemente contraditória, o BBI é inibidor do proteassoma e antiangiogênico. Entretanto, esses efeitos, mesmo ocorrendo de forma simultânea e produzindo resultados antagônicos podem ser compensatórios a favor da resposta final de inibição da angiogênese. A maior dificuldade de distribuição para o interior da célula e alcance do proteassoma pode explicar essa tendência.

### 5.3- Análise histológica das membranas coriolantóicas submetidas ao tratamento

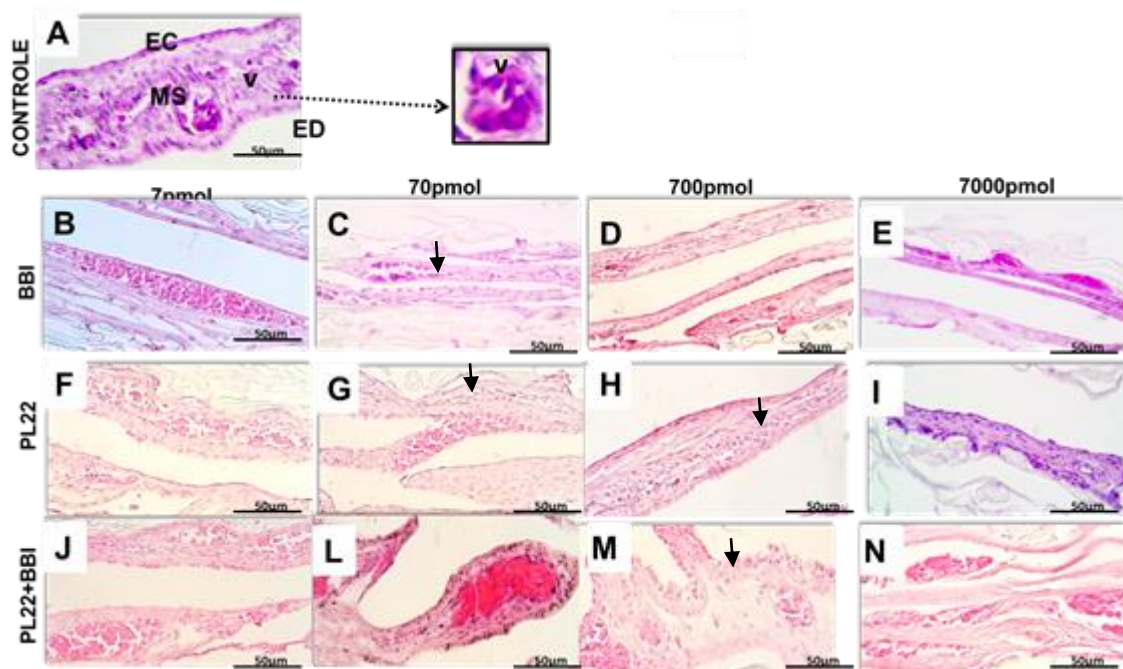
A figura 10 corresponde à prancha dos cortes histológicos das membranas corioalantóicas expostas a doses diárias de 7 a 7000 pmol de BBI, PL22, associação BBI e PL22 em cinco dias de tratamento e controle negativo.

A análise histopatológica das membranas do controle permitiu observação de um maior número de vasos em relação aos testes. Constatou-se a presença de formações vasculares ao longo de todo o mesoderma embrionário em todos os grupos. Não foi observado, em nenhum grupo, sinais de infecção ou necrose. Entretanto, os cortes histológicos dos grupos controle negativo, PL22 e associação PL22 e BBI, apresentaram sinais de moderada inflamação, provavelmente decorrente do veículo administrado nos controles e teste.

O grupo tratado com BBI apresenta um número reduzido de células inflamatórias infiltradas ao passo que os grupos que receberam os compostos PL22 e ou a associação PL22 e BBI, evidenciaram um infiltrado inflamatório moderado, de distribuição difusa, caracterizado pela presença de células mononucleares que diminui com aumento da dose. A partir das análises histopatológicas é possível concluir que o tratamento com as substâncias isoladas tem um efeito redutor no número de vasos sanguíneos e de células inflamatórias. A associação do BBI e PL22 resultou em menor efeito na diminuição da vascularização e da inflamação.

Os resultados da análise corroboram as avaliações feitas pela contagem direta dos vasos em microscópio digital do ponto de vista do efeito antiangiogênico. A atividade antiinflamatória observada é consistente com as informações veiculadas para as duas substâncias (Safavi *and* Rostami, 2012; Hernández-Ledesma *et al.*, 2009). O mecanismo pelo qual o BBI apresenta atividade antiinflamatória ainda não está elucidado. Uma possível via pelo qual o BBI inibe a inflamação pode ser por meio da inibição *chymase*, conhecido por inúmeras funções pró-inflamatórias, incluindo a ativação de procolagenase e a ativação de citocina inativa interleucina 1 $\beta$  de 31 Kda em sua espécie biologicamente ativa de 18 Kda. Além disso, o BBI inibe o influxo de polimorfonucleares nas áreas de inflamação (Kennedy, 1998). Estudo realizado por Dia e colaboradores (2009) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, demonstrou que a Lunasina inibe a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina-E2 (PGE2), comprovando sua atividade antiinflamatória.



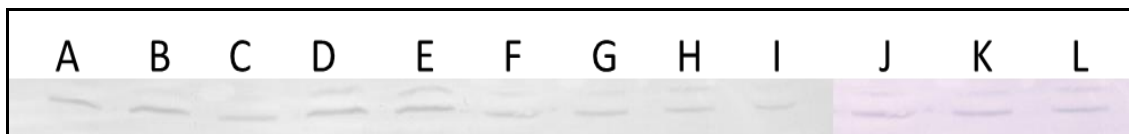


**Figura 10:** Fotomicrografias de cortes histológicos (4 µm, HE) de membrana corioalantóica de *Gallus domesticus* inoculados com BBI, peptídeo sintético da Lunasina (PL22) e associação de PL22 e BBI nas doses de 7000 a 7pmol . **A:** Controle negativo (água Milli-Q)- representação dos tecidos ectoderme (EC), mesoderme (MS) e endoderme (ED), em destaque vaso sanguíneo, **B a E:** Grupo BBI, **F a I:** Grupo PL22 e **J a N:** associação PL22 com BBI. ↓ indica infiltrado inflamatório. Barra= 25µm (10x), 50µm (40x). Inseto=zoom de 40x.

#### 5.4- Marcadores moleculares

Com objetivo de avaliar os marcadores de angiogênese foram obtidos extratos das membranas tratadas correspondentes às frações citosólicas e de membrana plasmática. Essa apreciação foi realizada por meio de medidas da expressão diferenciada da conexina-43 e do VEGF em Western blot. A figura 11 apresenta resultados do Western blot para o VEGF de membranas expostas a doses diárias 7 a 7000 pmol de BBI e PL22 em cinco dias de tratamento. A análise densitométrica não revelou alteração de expressão da concentração desses dois marcadores, avaliados pelo Western blot. Embora, esses sejam citados na literatura como indicadores de alterações da angiogênese (Finetti *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013), os mecanismos envolvidos no efeito observado pelas duas substâncias podem não resultar na variação da expressão dos mesmos. No caso do BBI a inibição da digestão da matriz extracelular pode não estar relacionada a alterações nas concentrações de conexina-43 ou VEGF. Embora estudos realizados por Saito e colaboradores (2007), demonstrar o aumento da

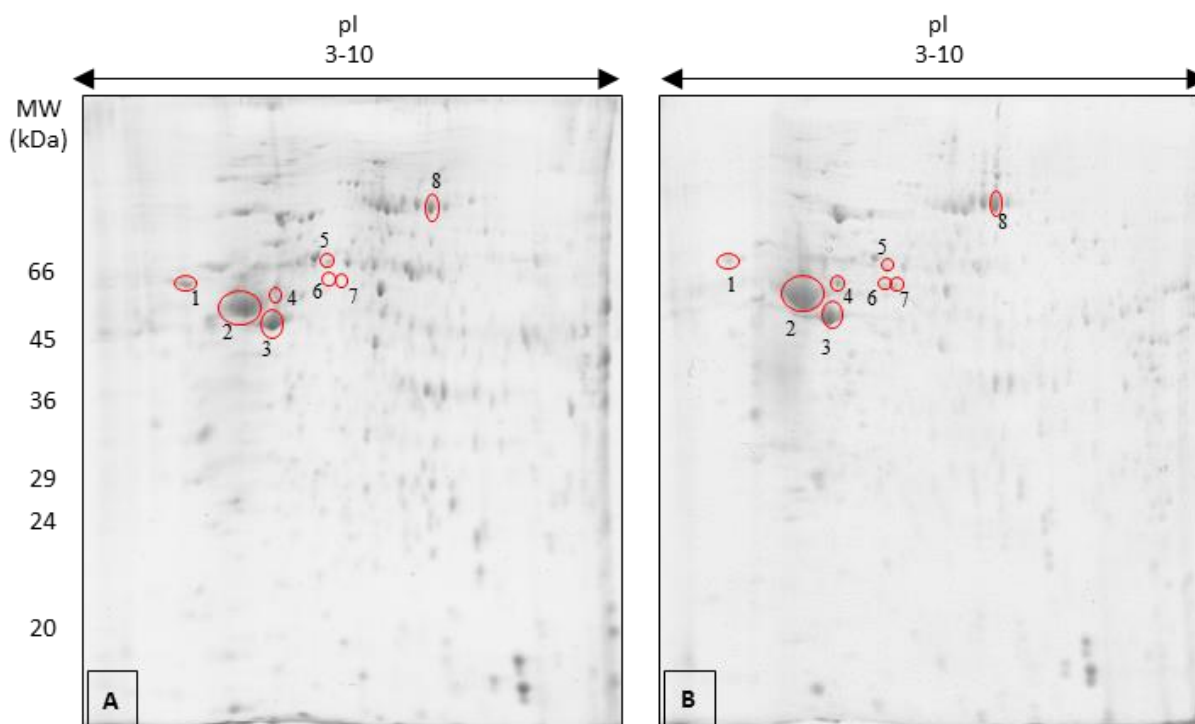
concentração de conexina-43 em células de osteossarcoma tratadas com BBI, garantindo um aumento na adesão celular (Saito *et al.*, 2007).



**Figura 11:** Western blotting. A: controle negativo, B: PL22 7000 pmol, C: PL22 700 pmol, D: PL22 70 pmol, E: PL22 7 pmol F: BBI 7000 pmol, G: BBI 700 pmol, H: BBI 70 pmol, H: BBI 7 pmol, I: PL22 + BBI 7000 pmol, J: PL22 + BBI 700 pmol, K: PL22 + BBI 70 pmol, L: PL22 + BBI 7 pmol.

### 5.5 Expressão diferencial de proteínas

A eletroforese bidimensional permitiu a constatação da diferença na expressão de proteínas nos tratamentos com BBI e PL22 em relação ao controle em experimentos realizados em triplicata técnica e biológica. Os géis bidimensionais foram obtidos e corados pelo Coomassie coloidal e analisados ferramenta LudesiREDFIN<sup>®</sup>. Os *spots* que correspondem a alterações de concentrações do componente proteico isolado foram evidenciados com círculos vermelhos demonstrando a ocorrência de pelo menos oito proteínas em situação diferenciada com o tratamento com BBI. As razões densitométricas entre os *spots* numerados podem ser vistas no quadro 02. A avaliação densitométrica permite evidenciar os *spots* 1, 6 e 7 cuja relação foi superior a 30%.



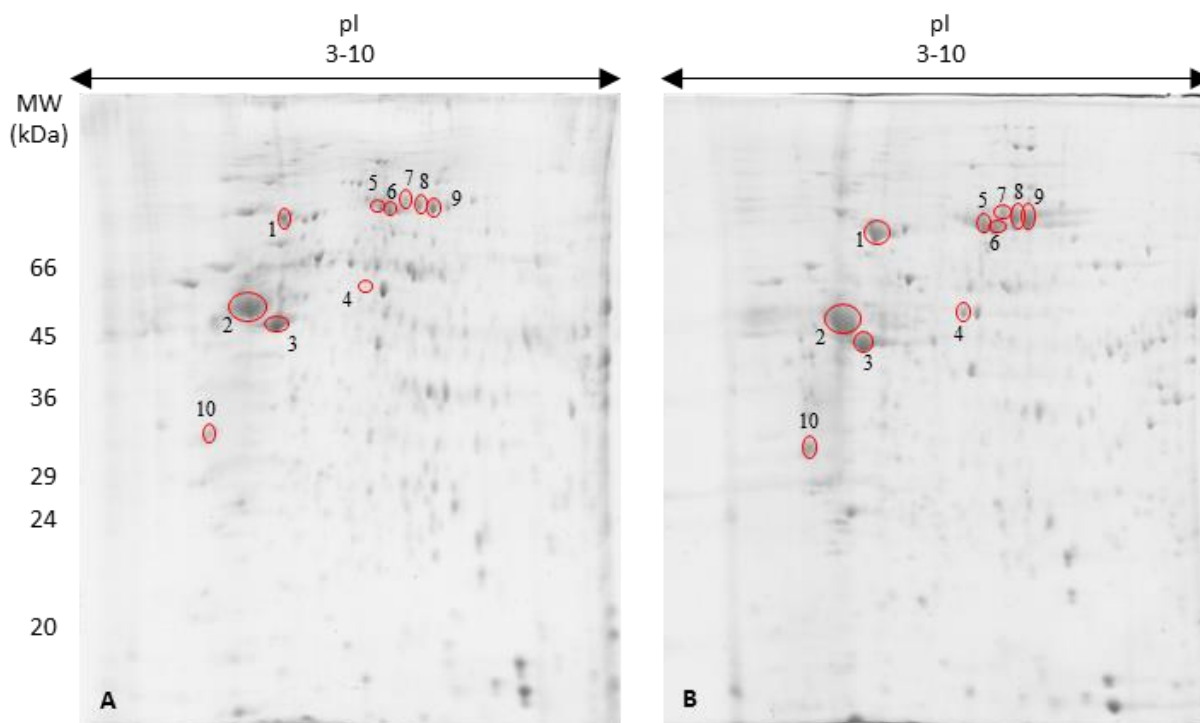
**Figura 12:** Géis bidimensionais: **A-** Controle negativo e **B-** BBI. SDS-PAGE 12%. Strip pH 3-10L. Corado com coomassie coloidal.

**Quadro 02:** Razão entre a densitometria do Controle pelo BBI

<i>Spot</i>	<i>Expressão proteica</i>
<b>1</b>	31 (-)
<b>2</b>	28 (+)
<b>3</b>	5 (+)
<b>4</b>	15(+)
<b>5</b>	4 (+)
<b>6</b>	33 (+)
<b>7</b>	48 (+)
<b>8</b>	24 (+)

\*(+ ) indica aumento na expressão proteica do teste em relação ao controle e o (-) indica diminuição na expressão proteica do teste em relação ao controle

A análise das membranas tratadas com PL22 demonstrou a ocorrência de pelo menos 10 proteínas em situação diferenciada. As razões densitométricas entre os *spots* numerados podem ser vistas no quadro 02 permitindo destacar os *spots* de 4 a 10 que apresentaram relações superiores a 30%.



**Figura 13:** Géis bidimensionais. **A-** Controle negativo e **B-** PDL22. SDS-PAGE 12%. Strip pH 3-10L. Corado com coomassie coloidal.

**Quadro 03:** Razão entre a densitometria do Controle pelo PL22

<i>Spot</i>	<i>Expressão proteica</i>
<b>1</b>	14 (+)
<b>2</b>	25 (+)
<b>3</b>	3 (+)
<b>4</b>	58 (+)
<b>5</b>	45 (+)
<b>6</b>	53 (+)
<b>7</b>	38 (+)
<b>8</b>	35 (+)
<b>9</b>	35 (+)
<b>10</b>	39(+)

\*(+) *indica aumento na expressão proteica do teste em relação ao controle e o (-) indica diminuição na expressão proteica do teste em relação ao controle*

As proteínas fracionadas pela eletroforese bidimensional de expressão diferenciada foram isoladas pela excisão dos *spots* e serão em breve analisadas pela espectrometria de massa. Esses experimentos apresentam como perspectiva a identificação de marcadores moleculares envolvidos na inibição da angiogênese promovida pelo BBI e PL22. Através desses estudos será possível investigar os mecanismos responsáveis pelos efeitos observados e a intensidade dos mesmos por meio da medida da expressão diferenciada.

## **CONCLUSÕES**

## VI- CONCLUSÕES

- BBI e PL22 apresentam aumento da atividade antiangiogênica com aumento da dose em ensaios de membrana corioalantóica em tratamentos de 05 doses diárias a partir de 70 pmol, permitindo concluir que ambas as substâncias apresentam atividade antiangiogênica em doses muito baixas;
- A associação de BBI e PL22 não produz efeito sinérgico na inibição da angiogênese sugerindo que a presença desses componentes no extrato de soja pode não ser vantajosa pelo fato da resposta do PL22 ter intensidade menor na associação do que em seu uso isolado;
- A análise da eletroforese bidimensional visando à avaliação da expressão diferenciada de proteína permitiu a detecção de *spots* com intensidades alteradas nos extratos de membrana tratados com BBI e PL22.

## **PERSPECTIVAS**

**VII- PERSPECTIVAS**

- A elevada atividade antiangiogênica para do BBI e PL22 colocam essas substâncias como potenciais adjuvantes no tratamento do câncer. Os estudos realizados nesse trabalho reforçam as atividades antitumorais descritas pela literatura para essas substâncias ao longo de 03 décadas;
- A partir desses estudos poderão ser propostas alterações de estrutura que venham aumentar a atividade antiangiogênica dessas substâncias e obtê-las por meio da síntese de peptídeo em fase sólida;
- Investigar na molécula de PL22 os segmentos de sequência essenciais para atividade por meio da alteração da sequência e remoção de resíduos;
- Avançar na avaliação da atividade antiangiogênica em modelo de mamífero, através de modelos de esponja, cultura de células por meio de experimentos bi e tridimensionais;
- Avançar na análise proteômica para investigação do mecanismo de ação e avaliação da resposta farmacológica.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Affara, N. I.; Andreu, P.; Coussens, L. M. Delineating protease functions during cancer development. **Methods Mol. Biol.** 2009, 539, 1-32.

Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J.; and Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. **Mol Biotechnol.** 2006, 33, 239-254.

Antão, C. M.; Malcata, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry.** 2005, v 43, n 7, p 637-650.

Armstrong, W.B.; Kennedy, A.R.; Wan, X.S.; Atiba, J.; McLaren, C.E. and Meyskens, F.L., Jr. (2000a). Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 9, 43-47.

Armstrong, W.B.; Kennedy, A.R.; Wan, X.S.; Taylor, T.H.; Nguyen, Q.A.; Jesen, j.; Thompson. W.; Lagerberg, W. and Meyskens, F.L., Jr. (2000b). Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase II a chemoprevention trial. **Clin Cancer Res.** 6, 4684-4691.

Arnold, F.; West, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.** 1991, 52, 407-422.

Auerbach, R.; Lewis, R.; Shinnars, B.; Kubai, L.; Akhtar, N. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. **Clinical Chemistry.** 2003, 49, 32-40.

Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J. A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos. **Dev Biol.** 1974, 41, 391-4.

Ausprunk, D.H., and Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvasc. Res.** 1977, 14, 53-65.

Bao, J., Sato, K., Li, M., Gao, Y., Abid, R., Aird, W., Simons, M., and Post, M. J. PR-39 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated I kappa B alpha degradation, **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2001, 281, H2612-2618.

Barbosa, J.A.R.G.; Silva, L.P.; Teles, R.C.L.; Esteves, G.F.; Azevedo, R.B.; Ventura, M.M.; Freitas, S.M. Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with  $\beta$ -Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases. **Biophysical Journal.** 2007, 92, 1638-1650.

Bisht, M., Dhasmana, D.C., and Best, S.S. Angiogenesis: Future of pharmacological modulation. **Indian J. Pharmacol.** 2010, 42:1, 2-8.

Borgono, C. A.; Diamandis, E. P. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. **Nat. Rev. Cancer.** 2004, 4, 876-890.

Clemente, A., Sonnante, G., Domoney, C. Bowman–Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. **Current Protein & Peptide Science**. 2011, 12, 358–373.

Carli, Alessandra de Paula; Vieira, Paula Melo de Abreu; Silva, Karina Taciana Santos; Cota, Renata Guerra de Sá; Carneiro, Cláudia Martins; Castro-Borges, William; Andrade, Milton Hércules Guerra. Bowman-Birk inhibitors, proteasome peptidase activities and colorectalpre neoplasias induced by 1,2-dimethylhydrazine in Swiss mice. **Food and Chemical Toxicology**. 2012,1405–1412.

Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat. Medicine**. 2000. 6, 389-395.

Declerck, Y.A.; Imren, S. Protease Inhibitors: Role and Potential Therapeutic use in Human Cancer. **European Journal of Cancer**; 1994, v. 30, n 14, 2170-2180.

Deshimaru, M., Yoshimi, S., Shioi, S., and Terada, S. Multigene family for Bowman-Birk type proteinase inhibitors of wild soja and soybean: the presence of two BBI-A genes and pseudogenes. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2004, 68, 1279-1286.

Dia, Vermont P. Structural property of soybean lunasin and development of a method to quantify lunasin in plasma using an optimized immunoassay protocol. **Food Chemistry**. 2013, 138 334–341.

Dia, Vermont P. *and* Mejia, Elvira Gonzalez. Lunasin potentiates the effect of oxaliplatin preventing outgrowth of colon cancer metastasis, binds to  $\alpha 5\beta 1$  integrin and suppresses FAK/ERK/NF- $\kappa$ B signaling. **Cancer Letters**. 2011, 313, 167–180.

Dia, Vermont P *and* Mejia, Elvira Gonzalez. Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression. **Cancer Letters**. 2010, 295 44–53

Dia, Vermont P.; Wang, W.; Oh, L.V.; Lumen, B.O.; Mejia, Elvira Gonzalez. Isolation, purification and characterisation of lunasin from deffated soybean flour and in vitro evaluation of its and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**. 2009, 114, 108-115.

Fear, G., Komarnytsky, S., Raskin, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. **Pharmacology & Therapeutics**. 2007, 113, 354–368.

Fields, Conor; Mallee, Paul; Muzard, Julien; Lee, Gil U. Isolation of Bowman-Birk-Inhibitor from soybean extracts using novel peptide probes and high gradient magnetic separation. **Food Chemistry**. 2012, 134 1831–1838.

Fields, G. B., and Noble, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **Int J Pept Protein Res**. 1990, 35, 161-214.

Folkman, J Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat. Med**. 1995. 1, 27–31.

Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. **J Nat Cancer Inst.** 1990, 82, 4–6.

Gallo, R. L., Ono, M., Povsic, T., Page, C., Eriksson, E., Klagsbrun, M., and Bernfield, M. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1994, 91, 11035-11039.

Galvez, A.F. & de Lumen, B.O. A soybean cDNA encoding a chromatin binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. **Nature Biotechnology.** 1999, v. 17, 495-500.

Gettins, P. G. Serpin structure, mechanism and function. **Chem. Rev.** 2002, 102, 4751-4804.

González-Rábade N.; Badillo-Corona J.A.; Aranda-Barradas J.S.; Oliver-Salvador Mdel C. Production of plant proteases in vivo and *in vitro* - a review. **Biotechnol Adv.** 2011 Nov-Dec; 29(6):983-96.

Hasina, R., Lingen, M.W. Angiogenesis in Oral Cancer. **J of Dental Education.** 2001, 65, 1282 - 1290.

Hernández-Ledesma, Blanca; Hsieh, Chia-Chien; Dia, Vermont; Mejia, Elvira González; Lumen, Ben O. Lunasin, a Cancer Preventive Seed Peptide. **Soybean and Healt.** 2011.

Hernández-Ledesma Blanca; Hsieh Chia-Chien; Lumen Ben O. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 2009, 18; 390(3):803-8.

Hernández-Ledesma Blanca and Lumen Ben. Lunasin: A Novel Cancer Preventive Seed Peptide **Medicinal Chemistry.** 2008:2 75–80.

Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M.S.; Wildiers, H.; Vanoosterom, A.T. & de Bruijn, E.A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Rev.** 2004, 56, 549-80.

Hurwitz, Hebert; Fehrenbacher, Louis; Novotny, William; Cartwright, Thomas; Hainsworth, John; Heim, William; Berlin, Jordan; Baron, Ari; Griffing, Susan; Holmgren, Eric; Ferrara, Napoleone; Fyfe, Gwen; Rogers, Beth; Ross, Robert; Kabbinavar, Fairouz. Bevacizumab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. **The New England Journal of Medicine.** 2004.

Ishida, T. Low-barrier hydrogen bond hypothesis in the catalytic triad residue of serine proteases: correlation between structural rearrangement and chemical shifts in the acylation process. **Biochemistry.** 2006,45, 5413-5420.

Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS; and Lumen BO. The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. **Cancer Letters.** 2007, 18, 255(1):42-8.

- Jung, M., Tak J, Chung WY, Park KK. Antiangiogenic activity of deoxoartemisinin derivatives on chorioallantoic membrane. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 2006, v. 16, 1227–1230.
- Karamysheva, A.F. Mechanisms of Angiogenesis. **Biochemistry**. 2008, 73, 751-762.
- Kato, Y.; Nagashima, Y.; Koshikawa, N.; Miyagi, Y.; Yasumitsu, H. and Miyazaki, K. Production of trypsins by human gastric cancer cells correlates with their malignant phenotype. **Eur J Cancer**. 1998, 34, 1117-11.
- Katrancioglu, N., Karahan, O., Kilic, A.T., Altun, A., Katrancioglu, O., Polat, Z.A. The antiangiogenic effects of levosimendan in a CAM assay. **Microvascular Research**. 2012, 83, 263–266.
- Kennedy, A.R. (1998b). Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacol Ther**. 78, 167-209.
- Koshikawa, N.; Hasegawa, S.; Nagashima, Y.; Mitsuhashi, K.; Tsubota, Y.; Miyata, S.; Miyagi, Y.; Yasumitsu, H. and Miyazaki, K. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leucocytes, and neurons in human and mouse. **Am J Pathol**. 1998, 153, 937-944.
- Kunimasa K, Ikekita M, Sato M, Ohta T, Yamori Y, Ikeda M, Kuranuki S, Oikawa T. Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo. **Cancer Science**. 2010, 01(11):2462-9.
- Larionova, N.J., Gladysheva, I.P., Tikhonova, T.V., Kazanskaya, N.F. Inhibition of cathepsin G and elastase from human granulocytes by multiple forms of Bowman-Birk type of soy inhibitor. **Biochemistry (Moscow)**. 1993, 58, 1437 – 1444.
- Li, Jian; Post, Mark; Volk, Rudiger; Gao, Youhe; Li, Min; Metais, Caroline; Sato, Kaori; Tsai, Jo; Aird, William; Rosenberg, Robert D.; Hampton, Thomas G.; Li, Jianyi; Sellke, Frank; Carmeliet, Peter and Simons, Michael. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. **Nature medicine**. 2000, v. 6, n 1.
- Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**. 2001, 61, 253–270.
- Liu, B.; Schofield, C.J. and Wilmouth, R.C. Structural analyses on intermediates in serine protease catalysis. **J Biol Chem**. 2006, 281, 24024-2405.
- Losso, J. N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 2008, 48, 94-118.
- Merrifield, R. B. Solid-Phase Peptide Syntheses. **Endeavour**. 1965, 24, 3-7.
- Missirlis, E., Karakulakis, G., Maragoudakis, M. E. Angiogenesis is associated with collagenous protein synthesis and degradation in the chick chorioallantoic membrane. **Tissue Cell**. 1990, 22, 419-426.

Ministério da Saúde. Estimativa Incidência de Câncer no Brasil. 2011.

Miyata, S.; Miyagi, Y.; Koshikawa, N.; Nagashima, Y.; Kato, Y.; Yasumitsu, H.; Hirahara, F.; Misugi, K.; Miyazaki, K. Stimulation of cellular growth and adhesion to fibronectin and vitronectin in culture and tumorigenicity in nude mice by overexpression of trypsinogen in human gastric cancer cells. **Clin. Exp. Metastasis**. 1998, 16, 613-622.

Negrão, Rita; Costa Raquel; Duarte, Delvim; Gomes, Tiago T.; Azevedo, Isabel; Soares, Raquel. Different effects of catechin on angiogenesis and inflammation depending on VEGF levels. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 2013, v 24, 435–444.

Nishida, Nayolo; Yano, Hirohisa; Nishida, Takashi; Kamura, Toshiharu. Angiogenesis in Cancer. **Vasc Health Risk Manag**. 2006, 2(3): 213–219.

Nyberg, P., Ylipalosaari, M., Sorsa, T., Salo, T. Trypsins and their role in carcinoma growth. **Exp. Cell Res**. 2006, 312, 1219-1228.

Papetti M and Herman I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2002, May; 282(5):C947-70.

Papiewska-Pajak, Izabela, *et al.* Autocrine effects of VEGF-D on endothelial cells after transduction with AD-VEGF-D<sup>ΔNAC</sup>. **Experimental Cell Research**. 2010.

Patan, S., Haenni, B., Burri, P.H. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken choriollantoic membrane: Pillar formation by folding of the capillary wall. **Microvasc. Res**. 1996, 51, 80-98.

Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical Significance of Angiogenesis in Gastrointestinal Cancers. **Annals of Surgery**. 2003, 238, 9–28.

Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D., and James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chem Rev**. 2002, 102, 4639-4750.

Rakashanda, Syed; Rana, Farukh; Rafiq, Shaista; Masood, Akbar; Amin, Shajrul. Role of proteases in cancer: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**. 2012, v. 7(4), p. 90-101.

Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**. 1997, 386, 671 – 674.

Ryan, C.A. Protease Inhibitors in Plants - Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. 1990, 28, 425-449.

Safavi, Farinaz; Rostami, Abdolmohamad. Role of serine proteases in inflammation: Bowman–Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Exp and Molecular Pathology**. 2012, 93.

Schweigerer, L., & Fotsis, T. Angiogenesis and angiogenesis inhibitors in paediatric diseases. **Eur. J. Pediatr**. 1992, 151, 472–476

Saito, Teruyoshi; Sato, Hiromi; Virgona, Nantiga; Hagiwara, Hiromi; Kashiwagi, Korehito; Suzuki, Kazuyuki; Asano, Ryuji; Yano, Tomohiro. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman–Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. **Cancer Letters**. 2007, 253, 249–257.

Sergei, D.V.; Gariev, I.A.; Uporov, I.V. Catalytic sites of hydrolases: structures and catalytic cycles. **Russ Chem**. 2005, 74, 61-76.

Srihari, Thummala; Arunkumar, Ramachandran; Arunkumar, Jagadeesan; Satyanarayana. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). **Biomedicine & Preventive Nutrition**. 2013, 3 53–58.

Tomanek, R.J., and Schatteman, G.C. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. **Anat. Rec**. 2000, 261(3), 126-135.

Turk, Boris. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nat Rev. Drug Discover**. 2006.

Voet, D.; Voet, J.G. and Pratt, C.W. Catálise enzimática. In Fundamentos de Bioquímica. Primeira edição. **Ed. Artes Médicas Sul**, Porto Alegre. 2000, 281-316.

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. Nati. Acad. Sci. U.S.A.** 1985, 82: 5395-5399.

Ware, J.H., Wan, X.S., Rubin, H., Schechter, N.M., Kennedy, A.R. Soybean Bowman Birk Protease Inhibitor Is a Highly Effective Inhibitor of Human Mast Cell Chymase. **Biochemistry and Biophysics**. 1997, 344, 133-138.

Walsh, Kenneth A. and Neurath, Hans. Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1964 Oct; 52(4): 884–889.

Zani, Marie-Louise; Moreau, Thierry. Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. **Biochimie**. 2010, 92, 1689-1704.