

ANDRÉ FRANCISCO DE CASTRO VIEIRA

ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE INIBIDORES DE TRIPSINA

Ouro Preto – MG, fevereiro de 2015



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

ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE INIBIDORES DE TRIPSINA

AUTOR: André Francisco de Castro 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, fevereiro de 2015

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).

V658a Vieira, André Francisco de Castro.
Atividade antiangiogênica de inibidores de tripsina [manuscrito] / André Francisco de Castro Vieira. - 2015.
xiv, 69f.: il.: color; grafs; tabs; Figuras e abreviações.

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

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Biotecnologia.

1. Inibidores da tripsina. 2. Neovascularização. 3. Soja. I. Andrade, Milton Hércules Guerra de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 615.014

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

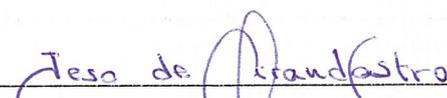
“Atividade antiangiogênica de inibidores de tripsina”

Aos onze dias do mês de fevereiro de 2015, às 14h00min, no Auditório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **André Francisco de Castro Vieira**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por**APROVAR**..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

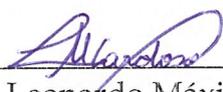
Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade
Presidente



Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro
Examinador (UFOP)



Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 11/02/2014

À minha família
meus pilares de apoio para todas as batalhas,
dedico esta conquista.

“Maturidade não é quando você começa a falar grandes coisas. É quando você começa entender pequenas coisas.”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Divinido Vieira de campos e Carmen Lucia Braga de Castro** pelo apoio moral para seguir meus sonhos sempre. A minha noiva **Thaise Ramalho** por apoiar os meus estudos e pela dedicação, companheirismo e compreensão.

Aos meus **avós** (*in memoriam*), por todo o apoio durante minha vida. Agradeço por todo esforço, carinho e dedicação que sempre tiveram comigo.

Aos meus amigos e primos (irmãos) que moram na cidade de Belo Horizonte pela amizade e paciência em todas as minhas visitas na cidade. Aos meus companheiros (irmãos) moradores e ex-alunos da Republica Arte & Manha de Ouro preto – MG pela alegria e atenção principalmente em horas de desabafo. Aos amigos que moraram comigo durante meus 2 anos na Repulica da rua Alfa em Ouro Preto.

Ao **Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade**, pela oportunidade e orientação durante o desenvolvimento do mestrado.

À toda **equipe do LEP** e ao técnico **José Henrique Braga Fortes**.

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

À **Universidade Federal de Ouro Preto** por todas as oportunidades oferecidas e pelo auxílio financeiro

À todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram no processo produtivo para o desenvolvimento e conclusão da pesquisa.

ÍNDICE

Resumo	viii
Abstract	x
Lista de abreviaturas	xi
Lista de figuras	xii
Lista de tabelas	xiii
Lista de gráficos	xiv
1. Introdução	2
1.1. Angiogênese.....	2
1.2. Papel fisiológico das proteases.....	5
1.3. Inibidores de Proteases.....	7
1.3.1. Inibidor Bowman-Birk.....	9
1.3.2. Peptídeos sintéticos referentes aos domínios inibitórios do BBI.....	11
1.3.3. Inibidor de <i>Cucurbita máxima</i>	14
1.4. Pentamidina.....	15
2. Justificativa	19
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. Materiais e métodos	23
4.1. Obtenção de extrato enriquecido de soja (BBIC) através do método.....	23
4.2. Obtenção de extrato enriquecido de <i>Cucurbita máxima</i>	23
4.3. Cromatografia de troca iônica Q. Sepharose.....	24
4.4. Cromatografia de afinidade de tripsina.....	24
4.4.1. Confeção da coluna de afinidade de tripsina.....	24
4.5. Caracterização dos inibidores por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	25
4.6. Síntese dos inibidores peptídicos.....	26
4.6.1. Ativação da resina.....	26
4.6.2. Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados....	27
4.6.3. Clivagem de peptídeos.....	28

4.6.4. Ciclização de peptídeos.....	28
4.6.5. Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida em fase reversa em sistema HPLC.....	28
4.6.6. Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas LCMS-IT-TOF <i>electrospray</i>	29
4.6.7. Determinação das soluções estoque de peptídeo.....	29
4.7. Ensaio Enzimáticos.....	30
4.7.1. Atividade inibitória anti-tripsina bovina.....	30
4.7.2. Cálculo da Atividade Inibitória (UAIN).....	31
4.8. Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóica de <i>Gallusgallus domesticus</i>	31
4.8.1. Quantificação do número de bifurcações dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóica <i>gallusdomesticus</i>	32
4.9. Análise estatística.....	32
5. Resultados	33
5.1. Purificação do inibidor Bowman-Birk (BBI).....	33
5.1.1. Purificação de BBI.....	33
5.2. Purificação do inibidor de <i>Cucurbita máxima</i> (CMTI).....	33
5.3. Purificação e caracterização dos peptídeos cíclicos.....	35
5.4. Purificação e caracterização dos peptídeos análogos aos domínios inibitórios do BBI de soja.....	39
6. Resultados referentes aos ensaios antiangiogênico.....	41
6.1. Atividade antiangiogênica de inibidores de tripsina em membrana de <i>Gallus domesticus</i>	41
6.1.1. Ensaio Antiangiogênico do inibidor Bowman-Birk.....	42
6.1.2. Ensaio Antiangiogênico de peptídeos sintéticos.....	44
6.1.3. Ensaio Antiangiogênico do Inibidor de <i>C. máxima</i> (CMTI).....	46
6.1.4. Ensaio antiangiogênico da Pentamidina.....	47
7. Discussão.....	52
8. Conclusões.....	58
9. Perspectivas.....	59
10. Referências bibliográficas.....	60

RESUMO

Os inibidores Bowman-Birk, comumente chamados de BBI, são moléculas proteicas caracterizadas pela presença de dois domínios independentes, capazes de inibir serino-proteases. Embora os mecanismos de atividade biológica dessas moléculas não estejam totalmente elucidados, o interesse por essa classe de inibidores está relacionado com a descoberta de que o BBI pode atuar como agente preventivo do câncer. A capacidade do BBI de prevenir a carcinogênese tem sido estudada extensivamente, tanto em sua forma purificada quanto na forma de extrato proteico de soja enriquecido de BBI, chamado de BBI concentrado (BBIC). Parte do efeito antitumoral pode estar relacionada a uma possível atividade anti-angiogênica, uma vez que proteases que degradam a matriz extracelular podem ter atividade reduzida na presença de inibidores de tripsina. Esse trabalho teve como proposta a avaliação da atividade anti-angiogênica de inibidores de tripsina e domínios sintéticos relacionados ao BBI. Nesse sentido foram avaliados os peptídeos inibidores de tripsina e quimotripsina, sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando-se o protocolo de síntese em fase sólida estabelecido por Merrifield (1963), o BBI purificado através de cromatografia de troca iônica, o inibidor de semente de abóbora CMTI purificado pelo método de cromatografia de afinidade e pentamidina. O inibidor BBI quando purificado em cromatografia de troca iônica demonstrou alta capacidade anti-angiogênica nas doses de 7000 até 70 pmols, enquanto quando purificado em cromatografia de afinidade ocorre à perda de praticamente toda sua atividade antitripsina e antiangiogênica, demonstrando a importância da integridade desse domínio na atividade. Os peptídeos sintéticos também foram ativos entre as doses de 7000 a 700 pmols, sendo a maior atividade observada para o peptídeo inibidor de tripsina. O inibidor de abóbora purificado em cromatografia de afinidade também apresentou resposta anti-angiogênica nas concentrações de 7000 a 700 pmols em intensidade semelhante ao inibidor de tripsina sintético. A atividade anti-angiogênica associada à inibição de tripsina promovida pelos inibidores naturais e análogos gerou uma resposta máxima de 40% de redução da angiogênese. Entretanto, a pentamidina apresentou-se ativa entre doses de 7000 a 7 pmols com uma redução de até 80% na angiogênese, possivelmente,

pelo fato de apresentar uma atividade antiproliferativa além da inibição de proteases. Esses resultados reforçam as evidências que inibidores de tripsina são dotados de atividade anti-angiogênica e que inibidores proteicos com propriedades antitumorais, como o BBI, podem exercer em parte, sua ação mediante a inibição da angiogênese.

ABSTRACT

The Bowman-birk inhibitors, generally called BBI, are protein molecules characterized for presence of two independent domains, able to inhibiting serine proteases. Although the biological activity of these molecules mechanisms are not completely understood, the interest in this class of inhibitors is related with the discovery that BBI can act as a cancer preventive agent. BBI's ability to prevent carcinogenesis has been studied extensively, both in purified form or in protein extract enriched soybean of BBI, called concentrated BBI (BBIC). Part of the anti-tumor effect may be related to the possible of anti-angiogenic activity, since proteases that degrade the extracellular matrix may have reduced activity in the presence of trypsin inhibitors. This work aimed the rating of the anti-angiogenic activity of trypsin inhibitors and synthetic fields related to BBI. In this sense we evaluated trypsin inhibitor peptides and chymotrypsin synthesized by our research group using the synthesis protocol in solid phase established by Merrifield (1963), BBI purified by ion exchange chromatography, the seed inhibitor pumpkin CMTI purified by affinity chromatography method and pentamidine. The BBI inhibitor purified in ion exchange chromatography showed high anti-angiogenic capacity in doses of 7000 to 70 pmoles, while when is purified in affinity chromatography lost almost all of antitrypsin activity and antiangiogenic. The synthetic peptides also are active between doses 7000-700 pmoles, showing the highest activity in the peptide for trypsin inhibition. The purified inhibitor pumpkin affinity chromatography also showed anti-angiogenic response in concentrations 7000-700 pmoles, similar intensity of the synthetic trypsin inhibitor. The anti-angiogenic activity associated with inhibition of trypsin promoted by natural inhibitors produced a maximal reduction of angiogenesis of 40%. However, the pentamidine was presented active between 7000-7 pmoles with a reduction of up to 80% in angiogenesis, possibly, because present an antiproliferative activity besides the inhibition of proteases. These results provide further evidence that trypsin inhibitors are equipped with anti-angiogenic activity and protein inhibitors with anti-tumor properties as BBI, can exert in part its action by inhibiting angiogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila	LCMS-IT-TOF - <i>Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight</i>
BApNA - N α -Benzoil-DLArginil-p-Nitroanilida	MEC - matriz extracelular
BTpNA - N α -Benzoil-LTirosil-p-Nitroanilida	MM - Massa Molecular
BBI - Inibidores do tipo Bowman-Birk	MMPs - Metaloproteases
BBI-E - BBI enriquecido	mM - Milimolar
BBI-PA – BBI purificado em coluna de afinidade de tripsina	m/z - Razão massa/carga
BCA - <i>BicinchoninicAcid</i>	nM - Nanomolar
CAM - Ensaio da Membrana Corioalantóica	PMM - Padrão de Massa Molecular
CMTI - Inibidor de Tripsina de <i>Cucurbita maxima</i>	PIQ – Proteína inibidora de quimotripsina
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais	PIT –Proteína Inibidora de Tripsina
DCM - Diclorometano	SDS - Dodecil sulfato de sódio
DIPC - Diisopropilcarbodiimida	SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
DMH - 1,2-dimetilhidrazina	SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
DMF - Dimetilformamida	TEMED - N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina
DMSO - Dimetilsulfóxido	TFA - Ácido trifluoracético
DTT - Ditioneitol	TIMPS - Inibidores de metaloproteases
FGF - <i>Fibroblast Growth Factor</i>	tBoc - t-Butiloxicarbonila
Fmoc - 9- Fluorenilmetiloxicarbonila	tBu - Terc-butila
HPLC - <i>High PerformanceLiquidChromatography</i>	UAF - Unidades arbitrárias de fluorescência
IC50 - Concentração Inibitória 50%	UAI - Unidade de Atividade Inibitória
Ki - Constante de inibição	uPA - Urokinase-typeplasminogenactivator
	UV - Ultravioleta
	VEGF - <i>Vascular endothelialgrowthfactor</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Precursor endotelial (angioblasto) montando a vasculogênese primitiva através da expansão e remodelação.....	2
Figura 2: Representação esquemática das pontes dissulfeto de quatro importantes inibidores de proteases.....	8
Figura 3: Estrutura do inibidor Bowman-Birk.....	10
Figura 4: Sequência de aminoácidos da família de serino proteases de abobora e suas constantes de associação K_a em tripsina bovina.....	14
Figura 5: Estrutura linear do inibidor de abobora CMTI.....	15
Figura 6: Estrutura química da pentamidina.....	16
Figura 7: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) do BBIC obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985).....	33
Figura 8: Gel de poliacrilamida 15% (BBI).....	35
Figura 9: Gel de poliacrilamida 15% (CMTI).....	37
Figura 10: Perfis cromatográficos em sistema HPLC dos peptídeos cíclicos sintetizados.....	39
Figura 11: Espectros de massas obtidos por LCMS-IT-TOF do tipo <i>electrosray</i> dos peptídeos inibidores cíclicos YCT-trip e YCA-quimo.....	40
Figura 12: Membranas corioalantóicas após inoculação tópica de cinco doses diárias do inibidor BBI.....	43
Figura 13 Membranas corioalantóicas após inoculação tópica de cinco doses diárias de 7 μ L de inibidores sintéticos de tripsina.....	45
Figura 14: : Membranas corioalantóicas após inoculação tópica de cinco doses diárias de 7 μ L CMTI de abóbora.....	47
Figura 15: Possíveis locais de hidrólise trípica da estrutura do inibidor BBI e CMTI.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de apresentação das famílias de enzimas proteolíticas.....5

Tabela 2: Peptídeos sintéticos baseados nas cabeças inibitórias do BBI, suas respectivas nomenclaturas e sequências.....26

Tabela 3: Valores de atividade inibitória referente aos inibidores purificados em cromatografia de troca iônica e afinidade.....38

Tabela 4: Valores de massa molecular encontrados por análise em LC-MS.....40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Extrato de soja purificado em cromatografia de troca iônica.....	34
Gráfico 2: Extrato de <i>Cucurbita maxima</i> purificado em cromatografia de afinidade.....	36
Gráfico 3: Atividade antiangiogênica dos inibidores Bowman-Birk.....	42
Gráfico 4: Atividade antiangiogênica dos inibidores sintéticos.....	44
Gráfico 5: Atividade antiangiogênica do inibidor CMTI.....	46
Gráfico 6: Atividade antiangiogênica da Pentamidiana.....	48
Gráfico 7: Comparação das atividades antiangiogênicas nas concentrações: 7000 e 700 pmols afinidade.....	56

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Angiogênese

Para o crescimento e manutenção dos tecidos é necessária a distribuição eficaz de oxigênio e nutrientes. A angiogênese (Figura 1) ou neovascularização é o processo fisiológico de formação de novos vasos sanguíneos, a partir da vasculatura pré-existente (Hoeben *et al.*, 2004), que facilita a chegada desses compostos aos tecidos. Esta formação vascular funciona como uma rota de transporte para células especializadas como as hemácias (Carmeliet & Jain, 2000). A primeira observação da formação de microvasculatura foi feita em 1853 por Meyer, que notou algumas estruturas sendo formadas em capilares de caudas de girino. Posteriormente em 1929 foi observado que células da musculatura lisa, diferenciadas a partir dos fibroblastos, se juntam com células endoteliais formando uma estrutura tubular (Mendonça & Coutinho-Netto, 2009).

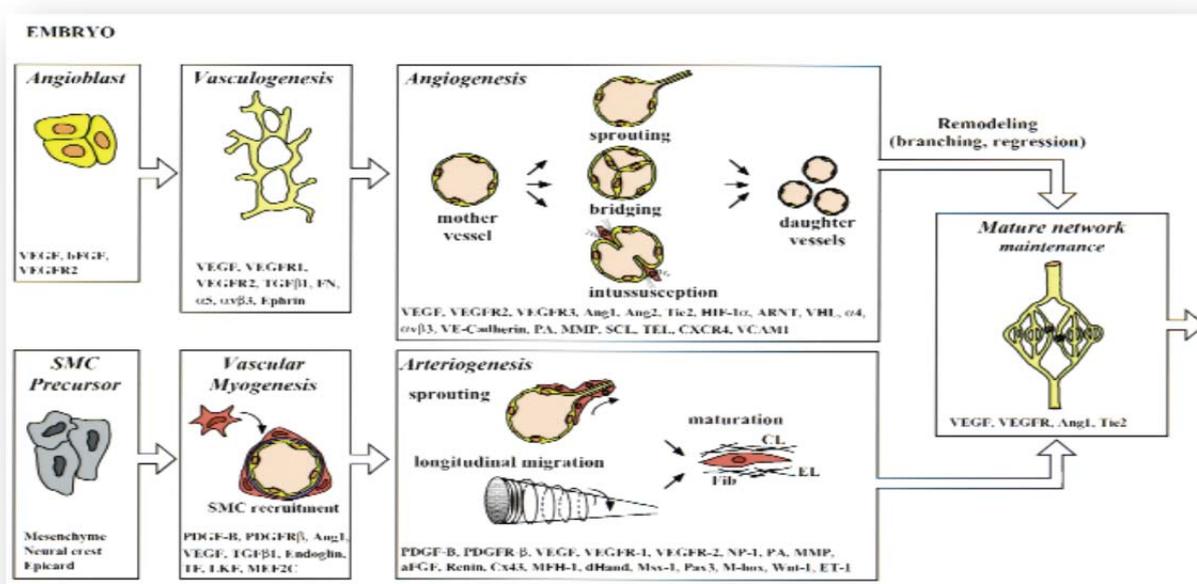


Figura 1: A figura mostra um precursor endotelial (angioblasto - Angioblast) dando início à formação da vasculogênese primitiva através da expansão e remodelação. Na mesma figura Células musculares lisas (Smooth Muscular Cells – SMC) recobrem as células endoteliais durante a miogênese vascular e estabilizando os vasos durante a arteriogênese. CL: colágeno, EL: elastina, Fib: Fibrina (Carmeliet, 2000).

O processo angiogênico envolve um balanço positivo e negativo rigoroso, onde moduladores como: fatores solúveis e proteases que degradam matriz extracelular (ECM), são secretados através do contato de células, promovendo o desenvolvimento do tecido vascular (Drewes *et al.*, 2012). Tais moduladores

secretados promovem divisão de células endoteliais, degradação da membrana basal e extracelular para formação da nova estrutura de transporte sanguíneo (Hoeben *et al.*, 2004).

Para ser possível a formação dos novos vasos sanguíneos é necessário que as células endoteliais rompam a barreira da membrana basal e migrem para o local onde receberam o estímulo angiogênico (Auerbach *et al.*, 2003). A expressão de moléculas na membrana celular auxilia a interação célula-célula e célula-meio extracelular, facilitando esta migração (Drewes *et al.*, 2012). Neste contexto, um dos fatores mais críticos para a regulação da angiogênese é a atuação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ele liga-se ao seu receptor de membrana VEGFR-2 e regula etapas como a proliferação, permeabilidade e sobrevivência tecidual (Pandya *et al.*, 2006). A atuação de todos os fatores estimulam células precursoras endoteliais que estão presentes na medula e no sangue periférico de adultos (Carmeliet, 2000).

A angiogênese possui uma sequência de eventos chave no amplo número de processos fisiológicos e patológicos, ela está presente em etapas fisiológicas como o crescimento embrionário, ovulação, cicatrização de feridas e regeneração de órgãos. No desenvolvimento patológico é possível observar o estímulo em doenças que possuem um baixo aporte sanguíneo causado por problemas como danos vasculares após a reperfusão, isquemia ou falhas cardíacas, porém a angiogênese está diretamente ligada também a patologias com excessiva vascularização como as retinopatias, psoríase, crescimento e metástase tumoral (Ribatti *et al.*, 2000; Griffioen & Molema, 2000).

No desenvolvimento das doenças a presença de macrófagos está associada com a secreção de vários sinalizadores de crescimento vascular como citosinas, fator de necrose tumoral, metaloproteases de matriz, entre outros. Esses fatores induzem consideravelmente a angiogênese local, aumentando o número de vasos para suprir as necessidades e nutrir o tecido alterado (Li *et al.*, 2000).

Judah Folkman foi o primeiro pesquisador a relacionar a angiogênese com uma patologia, procurando a relação entre o crescimento angiogênico e o tumor (Shing *et al.*, 1984). A partir do estudo de Folkman, dados encontrados mostraram a

relação direta do aumento angiogênico em tecidos com crescimento descontrolado. Além disso, estudos recentes mostraram que a incidência de metástase pode ser correlacionada com o número e a densidade de vasos sanguíneos em câncer de pulmão, mama, próstata, esôfago, colón, gástrico e melanomas (Etoh *et al.*, 2001).

O aparecimento de um acesso vascular sistêmico no tecido tumoral representa um passo limitante na progressão do tumor. Um modelo clássico de regulação da angiogênese tumoral ocorre pelo balanço dos fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos do organismo (Bergers & Benjamin, 2003).

Observando esta relação direta do desenvolvimento angiogênico com o crescimento tumoral, vários estudos criaram hipóteses de terapias através do impedimento do desenvolvimento vascular no local lesado. Alguns estudos pré-clínicos demonstraram grande potencial de inibidores de angiogênese no tratamento do câncer. Por isso a terapia antiangiogênica está sendo considerada um avanço promissor na busca constante por uma forma de tratamento para o câncer e outras patologias pró-angiogênicas (Griffioen & Molema, 2000).

As proteases se destacam como um dos mais importantes fatores no processo de formação de novos vasos sanguíneos. São estas proteínas que fazem o rompimento da membrana basal e abertura de caminho na matriz extracelular para formação de novos vasos (Van-Hinsbergh, Engelse & Quax, 2006). A partir disso, agentes quimotáticos e agentes mitogênicos facilitam a migração e proliferação de células no local para a formação da neovasculatura. Esse mecanismo de ação de proteases auxilia também na metástase tumoral, proporcionando uma rota de escape para células alteradas se alojarem e proliferarem em outros tecidos (Tomanek & Schatteman, 2000).

O crescimento tumoral e principalmente a metástase são considerados um péssimo prognóstico do desenvolvimento do câncer. Por esse motivo as proteases tem atraído olhares para testes de medicamentos, levando em conta que o impedimento da ação delas dificultaria a formação de vasculatura para nutrir o tecido lesado conseqüentemente atrapalhando seu crescimento, além de dificultar o escape de células metastáticas.

1.2. Papel fisiológico das proteases

As proteases são proteínas que catalisam a hidrólise de outras proteínas em regiões específicas formando peptídeos e aminoácidos (Prakash *et al.*, 2011), elas possuem diversas funções fisiológicas podendo exercer papel chave em processos como a coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, formação de tecidos, morfogênese, crescimento de tumores, ativação de zimogênios, entre outros (Tremacoldi, 2009). Em vegetais elas atuam principalmente na germinação de sementes e como reserva energética. Devido a este amplo campo de atuação, as proteases possuem grande importância biotecnológica, na busca por drogas ou vacinas específicas, na agricultura e na indústria alimentícia, tornando-as uma das principais classes de proteínas estudadas (Cudic & Fields, 2009).

As proteases constituem uma grande família, dividida em endoproteases e exoprotease, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Endoproteases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, enquanto as exoproteases atuam principalmente nas regiões N ou C terminais das cadeias polipeptídicas. Quatro classes principais de enzimas proteolíticas (tabela 1) são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (RAO *et al.*, 1998).

Família	Protease(s) representativa(s)	Sítios ativos
Serino proteases		
	Quimotripsina	
Serino protease I	Tripsina Elastase	Asp, Ser, His
	Calicreína pancreática	
Serino protease II	Subtilisina	Asp, Ser, His
Cisteíno proteases		
	Papaína	
Cisteíno protease	Actinidina Cathepsina	Cis, His, Asp
Aspártico proteases		
Aspártico protease	Penicilopepsina Renina	Asp
Metalo proteases		
Metalo protease I	Carboxipeptidase A	Zn, Glu, Try
Metalo protease II	Termolisina	Zn, Glu, His

Tabela 1. Tabela de apresentação das famílias de enzimas proteolíticas (Tremacoldi, 2009).

As proteases foram associadas em alguns processos do desenvolvimento do câncer e por muitos anos tem sido estudadas como potenciais marcadores terapêuticos (Bialas & Kafarski, 2009). Acreditava-se que as enzimas proteolíticas contribuíam para o desenvolvimento do câncer apenas nas etapas de invasão tumoral e metástase (Koblinski *et al.*, 2000). Atualmente, sabe-se que as proteases participam de todas as etapas de progressão do tumor, incluindo os processos de proliferação, adesão, migração, angiogênese, apoptose e evasão do sistema imune (Figura 1) (Laufs *et al.*, 2006; Nyberg *et al.*, 2006).

As metaloproteases (MMPs) foram as primeiras a serem considerados marcadores para tratamento antitumoral pelo seu papel na degradação de matriz extracelular (ECM), elas são compostas por colagenases, gelatinases, estromalisinas e metaloproteinases de membrana (Curran & Murray, 1999). As MMPs são secretadas como zimógenos inativos e alguns estudos *in vitro* puderam demonstrar que o sistema u-PA/plasmin localizado na membrana celular, direta ou indiretamente, ativa um número de pro-MMPs, tais como pro-MMP-1, pro-MMP-3, pro-MMP-9, pro-MMP-10 e pro-MMP-1345-47. Essa ativação zimogênica é regulada pelos inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPS) (Woessner, 1991). A ocorrência de um desbalanço entre as MMPs ativas e seus inibidores endógenos (TIMPS), promove uma degradação de tecido facilitando a formação de vasculatura e conseqüentemente o desenvolvimento das patologias (Cudic & Fields, 2009). A penetração ou degradação da membrana basal ou matriz extracelular (MEC) requer várias atividades proteolíticas diferentes, por isso, durante a remodelação da matriz ocorre uma cascata complexa de eventos proteolíticos envolvendo múltiplos grupos de proteases incluindo importantes membros da família das MMPs (Coussens & Werb, 1996).

Levando em conta a relevância da atuação das proteases no nosso organismo os diferentes grupos de proteases foram melhor caracterizados, tornando as serino proteases um dos mais estudados e hoje em dia. Elas são assim nomeadas pela presença do resíduo nucleófilo de serina presente no seu sítio ativo (Lopes, 2006). Tem sido observada a presença constante dessas proteases em patologias ligadas ao crescimento vascular e a degradação de moléculas, sendo a tripsina a protease mais observada nos trabalhos (Cudic & Fields, 2009).

A tripsina é uma importante serino protease, ela tem como principal função hidrolisar proteínas que possuem resíduos de lisina e arginina em sua composição (Lopes, 2006). Ela é uma importante proteína do sistema digestivo, e atua em diversos sistemas do organismo humano, como as cascatas biológicas e ativação de zimogênios (RAO, *et al.* 1998). Boa parte das proteases encontradas em processos patológicos são serino proteases, o que sugere a importância específica desta protease nos diversos estados fisiológicos ou patológicos (Bialas & Kafarski, 2009).

Os inibidores de proteases são bem estabelecidos como agentes preventivos do câncer por vários testes feitos em modelos *in vivo* e *in vitro*, porém, o mecanismo antitumoral não é totalmente elucidado (Kashiwagi *et al.*, 2011). A ação destes inibidores impedindo a função das serino protease desperta então muito interesse dos grupos de pesquisa relacionados a neovascularização.

1.3. Inibidores de proteases

Inibidores de proteases são moléculas que diminuem ou cessam a atividade de enzimas proteolíticas. Alguns inibidores possuem baixa massa molecular e suas estruturas são formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas podendo ser mantidas por pontes de dissulfeto o que proporciona a eles uma grande estabilidade sob condições extremamente desnaturantes (Lucena, 2010).

Muitas formas moleculares de inibidores são encontradas em animais, microrganismos e plantas (Pereira, 2005). Quase todos eles são produzidos na forma de zimogênios e ativados através da ligação do seu sítio de inibição ao sítio ativo das proteases (Laskowski & Qasim, 2000). Quando ocorre a interação reversível entre a protease e o inibidor, a atividade proteolítica das proteases é diretamente influenciada (Oliva & Sampaio, 2009).

Devido a sua grande diversidade os inibidores foram classificados em 18 diferentes famílias e a mais estudada hoje em dia é a de inibidores de serino protease, em que, o primeiro membro isolado e caracterizado dessa família foi o inibidor do tipo Kunitz, descoberto na década de 40 por Moses Kunitz (Barbosa *et al.*, 2007).

A maioria dos inibidores são encontrados em plantas e desempenham funções importantes como regulação de proteínas endógenas, acúmulo de proteínas de reserva e proteção das plantas contra insetos (Pereira, 2005), já os inibidores com função biológica em animais atuam regulando vários mecanismos de degradação proteolítica no organismo, promovendo um balanço rigoroso entre proteases e seus inibidores específicos, impedindo o aparecimento de diversas doenças (Bode & Huber, 1992).

A soja sempre recebeu muita atenção, certamente pelo fato desta semente possuir dois importantes inibidores de serino proteases entre seus nutrientes, o inibidor do tipo Kunitz e o inibidor Bowman-Birk (Tan-Wilson *et al.*, 1985). Evidências epidemiológicas indicam que em países asiáticos, que a soja é um dos principais ingredientes da dieta, a incidência e mortalidade por câncer, principalmente o câncer de mama, próstata e colón é muito menor do que em países da América do Norte (Messina & Barnes, 1991). Esta hipótese é suportada pelo trabalho de Du; Beloussow & Shen (2001), eles mostraram, em experimentos com câncer de mama induzidos em ratos, que a adição de soja em sua dieta conseguiu reduzir significativamente o tamanho do tumor nos animais.

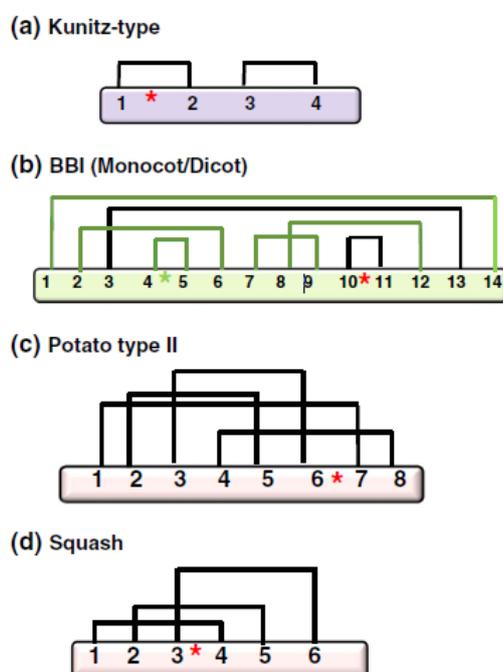


Figura 2: Representação esquemática das pontes dissulfeto de quatro importantes inibidores de proteases. * - Indicam os sítios reativos dos inibidores (Joshi, *et al* 2013).

A tripsina hidrolisa ligações peptídicas na extremidade carboxila de L-aminoácido básicos, como a arginina (**Arg**) e a lisina (**Lys**). Assim, muitos peptídeos naturais inibidores de tripsina possuem uma arginina ou lisina, que se ligam ao sítio ativo da enzima, localizado na vizinhança da tríade catalítica responsável pela catálise (Bertrand *et al.* 1996).

Ainda não é completamente compreendido o mecanismo pelo qual os inibidores de proteases atuam como compostos antitumorais. Várias linhas defendem a versão de que os inibidores atuam inibindo a ação de proteases específicas para a formação de matriz extracelular e de cascatas de defesa, impedem a nutrição e oxigenação do tecido cancerígeno prejudicando seu desenvolvimento (Hodivala-Dilke, 2009; Benjamin, 2003). Drewes *et al.*, (2012) mostram que os inibidores de tripsina do tipo Kunitz, oriundos da soja, possuem atividade antiangiogênica provavelmente pela inibição de alguns importantes estimuladores da formação de novos vasos.

Estas evidências despertam o interesse para a utilização de outros inibidores menores e de maior atividade inibitória como o CMTI de sementes de abóbora e o BBI de sementes de soja além da possibilidade de obter estas moléculas purificadas, possibilitando a comprovação da ação dos inibidores sem nenhum interferente da preparação. Estes inibidores através de suas características moleculares podem melhorar etapas como a biodisponibilidade do composto bem como a capacidade antiangiogênica em tecidos.

1.3.1. Inibidor Bowman-Birk

O inibidor Bowman-Birk (BBI) é uma proteína inibidora de serino proteases com 71 aminoácidos e que possui domínios inibitórios para as enzimas proteolíticas tripsina e quimotripsina, ele consegue inibir estas duas proteases simultaneamente e separadamente (Carli *et al.*, 2013). Com uma massa molecular de aproximadamente 8 kDa ele está presente em altas concentrações em sementes de dicotiledôneas, sendo ele o inibidor predominante encontrado em sementes de soja (Kashiwagi *et al.*, 2011).

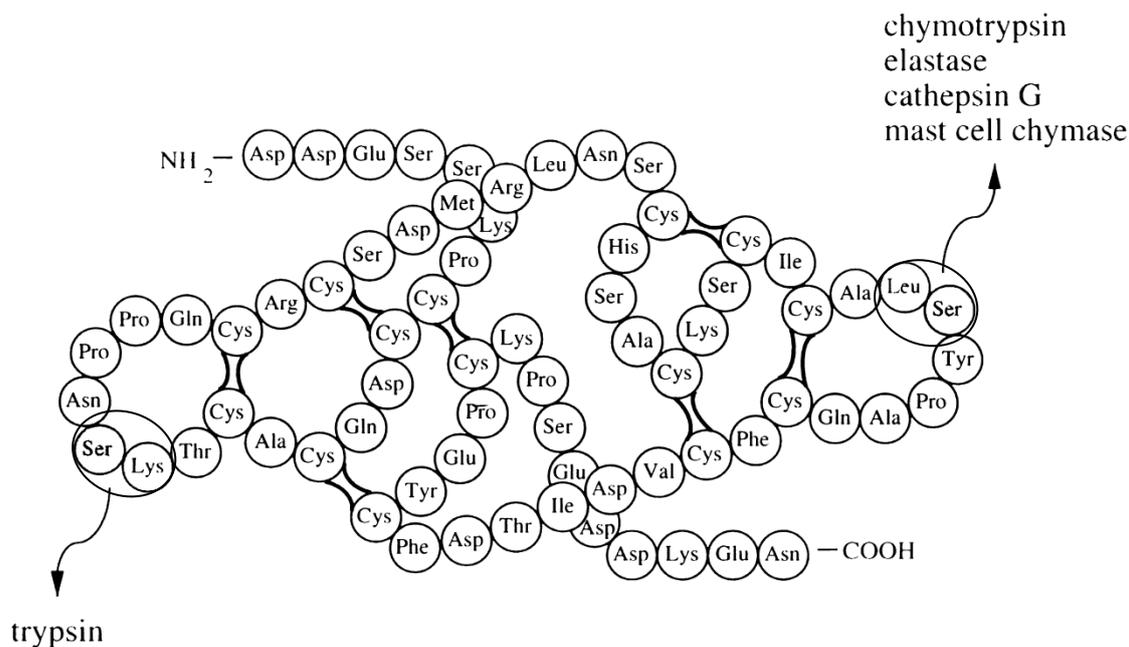


Figura 3: Estrutura do inibidor Bowman-Birk. O sítio de inibição de quimotripsina aparece circulado do lado direito da imagem e o sítio de inibição para tripsina aparece circulado do lado esquerdo da imagem.

Sua estrutura (Figura 3) molecular além de ser pequena, possui 7 pontes dissulfeto, proporcionando ao BBI uma estrutura muito rígida, o que possibilita a este inibidor atuar em situações extremas como pH muito baixo e temperaturas muito elevadas, sem perder sua estabilidade estrutural (Frank & Meyskens, 2006).

A estrutura dos sítios reativos desse inibidor possui 9 resíduos de aminoácidos e a posição desses depende do aminoácido que interage com o resíduo catalítico da enzima proteica. Varias isoformas de BBI podem ser encontradas em diferentes tipos de leguminosas. Esse polimorfismo pode ser atribuído à expressão de diferentes genes e às modificações pós-traducionais durante o desenvolvimento das sementes. Apesar dos BBI's serem produtos de uma família de multigenes e possuírem variações nas sequências de aminoácidos, eles apresentam sítios reativos bastante conservados (Clementea & Domoney, 2006).

As posições dos aminoácidos na estrutura desse inibidor faz com que ele seja semelhante aos substratos proteicos aos quais as proteases se ligam com afinidade elevada, ocorrendo assim à inibição. Essa ligação dos sítios enzimáticos ocorre de forma a impedir a mudança de conformação necessária à catálise, formando o complexo enzima-inibidor com uma barreira energética desfavorável à hidrólise (Longstaff, Campbell & Fersht, 1990).

Tem sido demonstrando que o extrato enriquecido de BBI, chamado BBI concentrado (BBIC), tem condições de inibir a carcinogenese *in vivo* no cólon, esôfago, fígado, pulmão e cavidade oral (Ledesma, Hsieh & Lumen, 2009). Sua atuação como composto anticarcinogenico é amplamente estudada, embora não se saiba qual é o real mecanismo de atuação que desencadeia esse efeito benéfico. Uma das suas características que mais chama a atenção é a estabilidade frente aos ácidos presentes no trato digestivo de humanos, o que possibilita a administração por via oral em testes anticarcinogênicos, possibilitando a criação de medicamentos menos agressivos como a quimioterapia e a radioterapia utilizados hoje em dia para tratamento de tumores (Pereira, 2005).

Embora vários trabalhos produzidos nas ultimas décadas tenham apontado o BBI como molécula responsável pelo excelente efeito protetor do câncer induzido quimicamente, grande parte dos trabalhos foram realizados com enriquecidos de soja (BBIC). Essas preparações possuem outras substâncias, também apontadas como quimiopreventivas. Diante disso, torna-se imprescindível o uso de preparações purificadas para avaliar a real contribuição de cada uma dessas substâncias para o efeito final.

1.3.2. Peptídeos sintéticos referentes aos domínios inibitórios do BBI

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) é feita utilizando um suporte solido chamado *bead*, que são polímeros com regiões funcionais possibilitando o acoplamento de aminoácidos através de ligação peptídica, foi desenvolvida por Bruce Merrifield (Merrifield, 1963). O peptídeo permanece ligado ao suporte polimérico durante toda a síntese e, ao final, é clivado, geralmente em uma condição ácida (Chan & White, 2000).

Os peptídeos são extremamente diversificados em termos funcionais. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas, antibióticos, adoçantes ou substratos de proteases. Todo o conhecimento sobre os peptídeos começou a ser acumulado a partir da década de 50, quando vários peptídeos ativos foram descobertos e tiveram

suas estruturas químicas determinadas (Machado *et al.*, 2004). Estas descobertas geraram um enorme interesse por várias classes de compostos. Uma delas foi à utilização de peptídeos sintéticos referentes aos domínios de inibição de moléculas, que se tornou um importante passo no conhecimento funcional dos seus inibidores nativos, possibilitando avaliar a relação estrutura-atividade das moléculas (McBride *et al.*, 2002). Com inúmeros avanços os peptídeos passaram a servir como provas inequívocas das identidades químicas e dos papéis fisiológicos das moléculas naturais (Massilia *et al.*, 2001).

Os peptídeos podem ser rapidamente hidrolisados em presença das proteases do nosso organismo. Por esta razão, eles podem apresentar baixa concentração plasmática além de baixa atividade quando administrados por via oral. Esse conhecimento impulsiona a realização de estudos de deleção, adição e modificação racional da sequência de aminoácido ou criação de estruturas ativas menores visando desenvolver análogos de moléculas biologicamente ativas capazes de melhorar suas ações, aumentando ou diminuindo sua potência e alterando sua estabilidade frente a proteases (Machado *et al.*, 2004).

Grande parte das tecnologias atuais de separação, análise, quantificação e identificação de peptídeos foram estabelecidas empregando peptídeos sintéticos de sequência, tamanhos e estabilidade química variada, podendo ser colocadas em destaque a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a espectrometria de massas (MS) e o *phage display* (Aboul-Enein, 1999). Observando esse nível de avaliação da molécula, por meio de experimentos de *phage display* e ELISA, foi levantada a possibilidade da construção de peptídeos sintéticos baseados nas cabeças inibitórias do BBI e que apresentem as características necessárias para a interação tanto com a tripsina quanto com a quimotripsina (Fernandez, *et al.* 2007).

A conformação canônica do *loop* reativo é muito importante para um posicionamento adequado e uma adaptação efetiva ao sítio ativo da enzima proteolítica, o que resulta na formação do complexo de inibição. O resíduo P1 desempenha um papel chave durante o processo, sendo ele quem define a especificidade do inibidor (Laskowski & Qasim, 2000).

Recentemente um grupo de pesquisa caracterizou um octadecapeptídeo isolado da secreção cutânea do sapo *Huia versabilis*, este contém um *loop* peptídico de 11 resíduos com um sítio reativo P1-P1' (Lys8-Ser9) entre duas cisteínas, o sítio reativo assemelha-se muito com as alças inibitórias dos BBI. Uma replicata desse peptídeo, nomeada HV-BBI, foi sintetizada e analisada quanto sua atividade anti-tripsina e anti-quimotripsina. Quando sintetizado em sua forma nativa (com um resíduo de lisina na posição P1), o peptídeo mostrou-se um potente inibidor de tripsina com Ki de 19nM. A substituição desse resíduo por arginina resultou em uma redução significativa da potência (Ki 57 nM), enquanto que a substituição por fenilalanina resultou na abolição completa da atividade inibitória da tripsina (Song *et al.*, 2008). Devido a vários fatores limitantes, dentre um dos principais a sua baixa biodisponibilidade quando utilizado *in vivo*, a construção de peptídeos sintéticos com maior estabilidade e que conservem a atividade biológica dos homólogos naturais são boas alternativas à aplicação de peptídeos na prevenção ou tratamento de diversas doenças (Wang & Shen, 2000).

As possibilidades de aplicação dos peptídeos sintéticos são inúmeras, possibilitando um grande avanço na produção de novas drogas com potencial e atividade antitumoral e melhorando o conhecimento biológico da molécula testada, reconhecendo o valor de cada região da molécula envolvida. Além disso, os estudos envolvidos em cada peptídeo irão permitir maior detalhamento do mecanismo de diferentes enzimas e conseqüentemente ampla abertura para o desenvolvimento de inibidores específicos, além do entendimento dos processos de interação de moléculas peptídicas com membranas biológicas, a obtenção de sistemas de transporte e liberação controlada de peptídeos biologicamente ativos (Marchetto, 2013).

Observando tais citações seria importante testar o potencial de peptídeos sintéticos referentes às cabeças inibitórias do BBI, e avaliar se a diminuição do tamanho da molécula proporciona uma melhora na biodisponibilidade e na capacidade antiangiogênica por parte do peptídeo sintético.

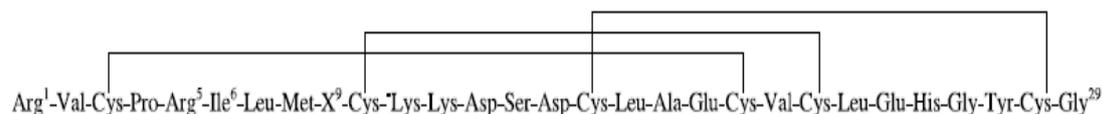


Figura 5: Estrutura linear do inibidor de abobora CMTI (Kazmierczak, et al. 2003).

Por causa do seu tamanho reduzido e estrutura compacta ele é uma molécula muito resistente em ambientes adversos com temperaturas elevadas e pH baixo, além de possuir uma alta atividade inibitória para tripsina e uma estabilidade excepcional no plasma com fácil penetração nas células (Mylne *et al.*, 2012). Estas características atraíram várias linhas de pesquisas para a caracterização da estrutura e função deste novo inibidor de serino proteases (Bode *et al.*, 1989).

O uso destes como modelo para desenvolvimento de uma terapia contra agentes angiogênicos bem como inibir a β -Tryptase e a elastáse, atuando como um agente terapêutico em desordens imunológicas, foi rapidamente aceita como uma ótima possibilidade (Daly *et al.*, 2013), porém, foi possível observar nos veículos de pesquisa utilizados para o levantamento bibliográfico, que poucos trabalhos foram desenvolvidos no intuito de estudar a atuação destes inibidores em doenças que tem seu desenvolvimento ligado diretamente com à atividade de proteases.

1.4. Pentamidina

O isotionato de pentamidina[*l*, 5-bis (4-amidinofenoxi) pentano] (figura 5), uma diamidina aromática, é uma droga não-peptídica que foi sintetizada na década de 40 como agente anti-protozoário entre os anos de 1967 e 1984 atuando em protozooses causadas por *Leishmania* e *Trypanosoma* (Parker *et al.*, 1993). Em 1958 foi publicado o primeiro dado concreto do uso de pentamidina no tratamento de crianças com pneumonia causada por *P. Carinii* (Sands, Kron & Brown, 2013). Porém, este composto apesar de ter um efeito farmacológico importante no tratamento de patologias como as citadas a cima, ele causa reações adversas muito graves, principalmente no fígado, o que faz com que sua administração seja na maioria das vezes feita apenas em casos extremos (Paula *et al.*, 2003).

As serino proteases tem um papel importante para a produção de diversos medicamentos, ela está associada a uma grande quantidade de processos biológicos como a digestão de membranas, coagulação sanguínea e fertilização. A sua especificidade por arginina e lisina, as quais estão presentes em muitos inibidores naturais, proporcionou a síntese de diversos inibidores baseados nesses grupos, por exemplo benzamidina, cuja estrutura mimetiza a da arginina, é o componente primário de muitos inibidores maiores e mais complexos (Talhout *et al.*, 2003). A estrutura destes inibidores sintéticos semelhante a da arginina, é componente primario da maioria dos outros inibidores sintéticos (Bode & Schwager, 1975). Estes compostos, sintéticos ou organicos, quando presentes no local de ação, posiciona-se no sítio que determina a especificidade da proteína, nesse caso o sitio S₁ da tripsina, sendo então estabilizados por interações hidrofóbicas e ligações eletrostaticas no bolso do sítio S₁ (Moreira, 2007).

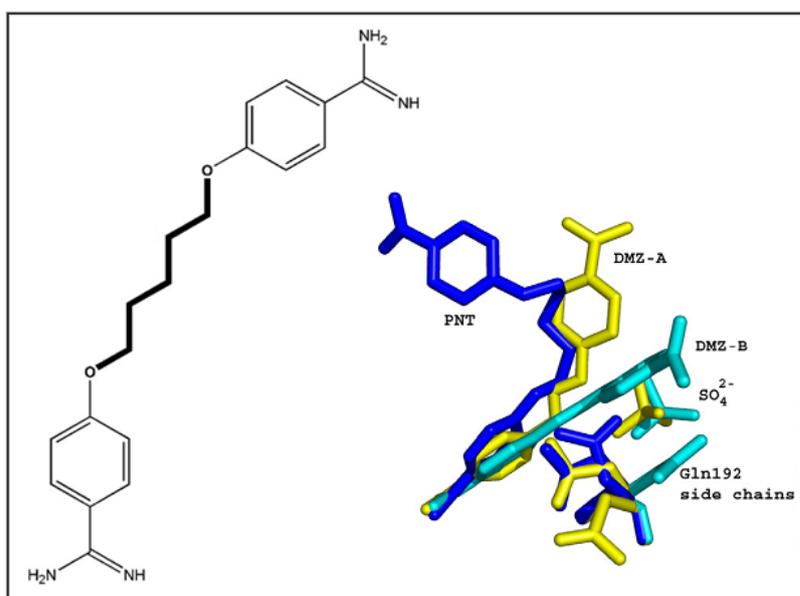


Figura 6: Estrutura química da pentamidina (à esquerda) e ligação do fármaco e de outros derivados da benzamidina ao sítio ativo da β -tripsina bovina (à direita), com as múltiplas conformações adotadas pela cadeia lateral da Glutamina (Gln192): -tripsina/pentamidina (azul escuro), -tripsina/diminazeno-A (amarelo) e -tripsina/diminazeno-B (azul claro). Adaptado de Perilo *et al.*, 2010.

Trabalhos publicados indicam que uma das maiores influencias do efeito da pentamidina se da pela sua ação direta no DNA (Hildebrandt *et al.*, 1998; Chow *et al.*, 2004 & Kobayashi *et al.*, 2010). Recentemente descobriu-se que este medicamento tem um alto potencial anticarcinogênico, principalmente para o

tratamento do melanoma através da inibição da interação entre a proteína S100B, uma proteína de 21,5 kDa, com a proteína p53 (Markowitz *et al.*, 2004). A proteína p53 é um ativador vital de vários genes envolvidos na apoptose e no controle do ciclo celular, a estabilização dessa proteína em processos neoplásicos impede o crescimento inapropriado de células e funciona como um agente supressor do tumor (Vousden & Lane, 2007). Sabe-se que a proteína S100B liga-se à p53 inibindo a sinalização correta para a transcrição, atrapalhando todo o ciclo celular normal (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2005). A pentamidina atua ligando-se ao sítio da proteína S100B específico para a proteína p53, essa interação mantém a estabilização e a fosforilação C terminal da p53, permitindo a regulação do ciclo celular (Smith *et al.*, 2010).

Embora seja conhecida a ação terapêutica da pentamidina agindo na transcrição do DNA, não se conhece a ação da pentamidina sobre outras vias que impendem à formação vascular o que pode influenciar diretamente no retrocesso do tumor. O efeito benéfico completo observado no tratamento pode ser relacionado a um sinergismo da ação do medicamento em vários mecanismos do organismo. Sua possível atuação sobre inibição de proteases tripsina-símiles pode atuar como uma chave para impedir a nutrição do tecido impedindo o crescimento vascular descontrolado (Puckowska, Midura-Nowaczek & Bruzgo, 2008).

Sem dúvida muitas questões ainda permanecem em relação aos efeitos clínicos da pentamidina, podendo atuar diferentes processos. Assim, espera-se que algumas dessas questões sejam respondidas em um futuro próximo (Sands, Kron & Brown, 2013).

Justificativa

2. Justificativa

Apesar do crescente aumento no número de casos novos de câncer no Brasil e no mundo observa-se uma redução na taxa de mortalidade, fato este que pode ser atribuído às constantes e incessantes pesquisas nas áreas de diagnóstico e tratamento dessa doença (IARC, 2010). O sucesso da terapia e consequente redução na mortalidade dos pacientes acometidos por essa doença baseiam-se principalmente na detecção precoce e na evolução das técnicas utilizadas para o tratamento dessa doença.

Nas décadas de 80 e 90 trabalhos relataram a atividade de inibidores de tripsina e quimotripsina como agentes anticarcinogênicos (Barbosa *et al.*, 2007). Entretanto pouco se sabe sobre o real mecanismo de ação desses inibidores. O trabalho de avaliação do potencial antiangiogênico de diferentes tipos e classes de inibidores como o que desenvolvemos, pode ajudar muito a compreensão do mecanismo de ação antitumoral, fornecendo uma informação importante para melhorar substancial na prevenção e no tratamento do câncer.

Objetivos

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antiangiogênico dos inibidores de tripsina purificados (BBI, CMTI), e da pentamidina, além de sintetizar e avaliar a atividade antiangiogênica de peptídeos inibitórios de tripsina e quimotripsina análogos ao BBI

3.2. Objetivos específicos

- Obter BBI purificado em cromatografia de troca iônica;
- Obter CMTI purificado em cromatografia de afinidade;
- Sintetizar e purificar peptídeos correspondentes às cabeças inibitórias antitripsina e anti-quimotripsina do inibidor Bowman-Birk;
- Avaliar o possível efeito antiangiogênico dos inibidores BBI e dos domínios inibitórios sintéticos;
- Avaliar o possível efeito antiangiogênico do inibidor CMTI;
- Avaliar o possível efeito antiangiogênico da pentamidina em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*.

Materiais e Métodos

4. 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 2013/184.

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

Os extratos concentrados de BBI foram obtidos conforme a metodologia proposta por Yavelowet al. (1985) e modificada por nosso grupo de pesquisa. Sementes de soja *Glycine max* trituradas em liquidificador foram delipidadas com 10 volumes de acetona P.A. O material triturado e delipidado foi macerado por 24 horas em citrato de sódio 0,05M pH 4,0 e ao final da maceração filtrado em gaze. Foi procedida uma precipitação *overnight* em solução contendo etanol a 60% em ambiente com temperatura de 5°C. O extrato foi centrifugado a 4724 g por 30 minutos e aproveitado o sobrenadante. Posteriormente, o produto aproveitado passou por nova etapa de precipitação *overnight* com etanol a 80% em com temperatura de 5°C. Ao fim desta etapa o sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi ressuspendido em água destilada.

4.2. Obtenção do extrato enriquecido de *Cucurbita maxima* (CMTI)

Os extratos concentrados de CMTI foram obtidos conforme a metodologia proposta por Huang et al. (1999) e modificada por nosso grupo de pesquisa. Sementes de Abobora *Cucurbita máxima* cortadas com tesoura e macerados *overnight* a 5° C com solução de Citrato de sódio 0,05M em pH 4,0. Posteriormente o material extraído foi filtrado em gaze e centrifugado a 6000 rpm por 2 horas. Foi retirada a camada de lipídeo que se formou no extrato e aproveitado o sobrenadante.

4.3. Cromatografia de troca iônica Q. Sepharose

O extrato enriquecido de proteínas de soja, preparado como descrito no item 4.1., foram submetidos à cromatografia de troca aniônica em Q. Shepharose. A coluna utilizada foi previamente equilibrada em tampão de bicarbonato de amônio 0,01M pH 8,5. As proteínas foram eluídas com concentrações de NaCl de 0,1M a 0,5M, as frações eram de 4 mL a cada 2 minutos. O acompanhamento das eluições foi realizado em Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® duplo feixe no comprimento de onda de 280 nm.

4.4. Cromatografia de afinidade de tripsina

Os extratos de proteína de Abobora, pré-enriquecidos como descrito no item 4.2., foram submetidos à cromatografia de afinidade de tripsina, confeccionada em Sepharose 4B. A coluna utilizada foi previamente equilibrada em tampão A de bicarbonato de amônio 0,01M pH 8,5. Após aplicar o extrato enriquecido inicial a eluição da cromatografia foi iniciada utilizando primeiramente o tampão A, para limpeza da coluna e retirada das ligações inespecíficas, posteriormente procedeu-se uma segunda lavagem com NaCl 0,1M a fim de retirar qualquer interação iônica entre a coluna e outras proteínas da solução enriquecida, por fim as proteínas foram eluídas com HCl 0,1M, para o desligamento completo da ligação entre a tripsina da cromatografia e o seu inibidor específico CMTI em frações de 1mL recolhidas a cada 1 minutos e 40 segundos. O acompanhamento das eluições foi realizado em Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® duplo feixe no comprimento de onda de 280 nm.

4.4.1. Confeção da coluna de afinidade de tripsina

A sepharose 4B, foi inicialmente ativada com epicloridrina, em seguida procedeu-se a aminação da agarose epóxi ativada a amino agarose. Para a ativação da succinilamino agarose com N-hidróxisuccinimida, lavou-se a succinilamino agarose extensivamente com dioxano para tornar anidra. Adicionou-se hidróxisuccinimida e diclohexilcarbodiimida em pó à suspensão para uma concentração final de 0,1M cada, agitando-se, continuamente e posteriormente a

reação foi incubada por 70 minutos à temperatura ambiente. Para acoplamento do ácido ϵ -aminocapróico: preparou-se uma solução de ácido ϵ -aminocapróico (2,6 g/100 mL), em NaHCO_3 0,01 M, NaCl 0,9% pH 7,5 e suspendeu-se a resina em três volumes dessa solução. Manteve-se a suspensão à temperatura ambiente por 1 hora, sendo realizada a sua ativação com N-hidróxisuccinimida. Para realizar o acoplamento com tripsina, lavou-se, rapidamente, a resina em funil com 50 mL de água destilada (paracada 20g de resina), e transferiu-se, imediatamente, para um béquer contendo 5mg de tripsina (para cada grama de gel drenado) solubilizado em NaCl 0,9% 0,01M NaHCO_3 , pH 7,5 (três volumes). Lavou-se a resina e incubou-se com etanolamina 0,1M pH 9,0 por 1 hora à temperatura ambiente. A solução foi misturada no tubo e ficou sob agitação por 12 horas a 4°C. A sepharose foi lavada por três vezes, com 10 mL de tampão bicarbonato e incubada com 10mL de glicina 0,2M, em tampão bicarbonato a 4°C por 12 horas. Por fim a resina foi lavada em 25 mL de tampão bicarbonato 0,1M, seguido de 25 mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 4, seguido de nova lavagem com 25 mL de tampão bicarbonato.

4.5. Caracterização dos inibidores por eletroforese em gel de poliacrilamida

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

Os géis foram preparados com os seguintes reagentes:

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

- Água milli-Q q.s.p 10 mL.

As amostras foram reduzidas com ditioneitol (DTT) a 10 mM por 30 minutos à 65°C no bloco térmico e posteriormente alquiladas com iodoacetamida a 40 mM por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Após redução e alquilação, as amostras foram diluídas (1:2) em tampão contendo Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4% p/v e glicerol 20% v/v, azul de bromofenol 0,002% p/v, e submetidas ao banho de água fervente por 5 minutos para desnaturação total das proteínas.

4.6. Síntese dos inibidores peptídicos

Os inibidores peptídicos de tripsina e quimotripsina derivados do BBI (Tabela 1) foram sintetizados manualmente sob a forma solúvel, utilizando-se o protocolo de síntese em fase sólida estabelecido por Merrifield (1963), com algumas modificações. O processo adotado neste trabalho utiliza o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos grupos α -amino, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais. A resina empregada para o acoplamento dos aminoácidos foi a *RinkAmideResin HL* (Merck, Alemanha) a 0,78 mmol/g, da qual se utilizou a quantidade necessária para um rendimento de 40 μ moles de peptídeo por síntese.

Peptídeo	Nomenclatura	Sequência
Cabeça inibitória de tripsina	YCT-trip	YCTKSIPPQCG
Cabeça inibitória de quimotripsina	YCA-quimo	YCALSYPAQCG

Tabela 2: Peptídeos sintéticos baseados nas cabeças inibitórias do BBI, suas respectivas nomenclaturas e sequências. Em vermelho estão destacados os aminoácidos referentes ao sítio de interação do inibidor.

4.6.1. Ativação da resina

Antes da ligação do primeiro derivado de aminoácido, 40 μ moles 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 3mL 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 2mL de cada solvente por lavagem. Todas as lavagens foram realizadas com auxílio de uma bomba de vácuo.

4.6.2. Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados

Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de quatro vezes (160 μ 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 2mL de DMF, acrescido de 25 μ L de diisopropilcarbodiimida (DIPC) e 23 mg de acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) (*oxymapure*). O DIPC e a *oxymapure* 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 μ L de uma solução 1:1 de DIPC e anidrido acético foram adicionados em 1mL 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 α -amínicos (remoção do grupo Fmoc), após a incorporação de cada aminoácido, foi realizada lavando-se a resina com 3mL 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.

4.6.3. 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 3mL 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 5mL de solução de clivagem contendo 95% de TFA. Para os peptídeos contendo cisteína, a solução de clivagem continha 2,5% de β -mercaptoetanol, a fim de se evitar a formação de pontes dissulfeto. 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, os precipitados foram lavados com éter etílico e centrifugados por três vezes a 1.500 gpor 5 minutos. Na última etapa, o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspendido em 3mL de água milli-Q. Os peptídeos correspondentes às cabeças inibitórias tradicionais foram submetidos ao processo de ciclização.

4.6.4. Ciclização dos peptídeos

Para os peptídeos correspondentes às cabeças de inibição de tripsina e quimotripsina, foi utilizado o processo de ciclização que permite a oxidação e consequente formação de pontes dissulfeto entre as cadeias laterais de cisteínas. Os peptídeos liofilizados foram dissolvidos em 50 mL de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 7.4, contendo 16% de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos contendo as soluções foram mantidos sob agitação por 48 horas na ausência de luz e novamente submetidos ao processo de liofilização. Os peptídeos foram purificados em sistema de HPLC (*High PerformanceLiquidChromatography*) e caracterizados em espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF com ionização do tipo *electrospray*.

4.6.5. Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida em fase reversa em sistema HPLC

Os peptídeos sintetizados em fase sólida foram submetidos à cromatografia de fase reversa para a análise de sua pureza. As cromatografias foram realizadas

em coluna C18 (250 mm x 10 mm) (Lichrocart 250-10 Purospher-Shimadzu®), em sistema HPLC Shimadzu®. A coluna foi previamente equilibrada com uma solução de água mili-Q e TFA 0,1%. Alíquotas de ambos os peptídeos (20 µL) foram eluídas em um gradiente de acetonitrila (ACN) variando de 25 a 60% em TFA 0,1% durante 30 minutos com uma vazão de 1mL/minuto, monitorando-se a eluição a 280nm. Após a purificação, os peptídeos foram caracterizados e identificados por espectrometria de massas.

4.6.6. Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas LCMS-IT-TOF *electrospray*

Os peptídeos purificados foram analisados por espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF (*Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight*), que opera por ionização do tipo *electrospray* (Shimadzu®). O equipamento foi calibrado utilizando trifluoroacetato de sódio. A voltagem capilar foi de 4500 V no modo positivo de ionização, com tempo de acumulação de 10 ms. As amostras foram aplicadas através de injeções diretas de alíquotas de 5µL. Os espectros obtidos foram comparados com as massas moleculares previstas pelo software *ExPASy – Compute PI/Mw tool* (disponível em http://web.expasy.org/compute_pi/).

4.6.7. Determinação da concentração das soluções estoque de peptídeo

Após a constatação da pureza, cada solução contendo os peptídeos (que possuem resíduos de tirosina em suas sequências) foi padronizada para a obtenção de dados experimentais. Foi empregado o método de Edelhoch (1967) para determinação teórica do coeficiente de extinção molar (ϵ) em λ 280 nm. Assim, tem-se:

- Método de Edelhoch para determinação da ϵ de peptídeos e proteínas:

$$\epsilon \text{ (L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = (\text{n}^\circ \text{ de Trp}) \cdot (5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) + (\text{n}^\circ \text{ de Tyr}) \cdot (1280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) + (\text{n}^\circ \text{ de Cys}) \cdot (125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

O valor de ϵ é aplicado na equação de Lambert-Beer para determinação da concentração da amostra:

- Equação de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$

onde 'A' é a absorvância da solução de peptídeos em λ 280 nm, ' ϵ ' é a absorvidade molar calculada pelo método de Edelhoch ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), 'b' é o caminho óptico (1 cm) e 'c' a concentração ($mol \cdot L^{-1}$).

4.7. Ensaio Enzimático

4.7.1. Atividade inibitória antitripsina bovina

A determinação da atividade tripsínica foi feita de acordo com Erlanger *et al.*, (1961). O substrato cromogênico usado foi o cloridrato de N- α -benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (DL-BAPNA), que foi preparado dissolvendo-se 196 mg do composto em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para obter a concentração de 9×10^{-2} M. Essa solução estoque foi mantida no congelador e diluída para a concentração de 9×10^{-4} M, no momento do uso, com tampão Tris-HCl 0,1 M pH8,1 contendo $CaCl_2$ 20 mM.

Os tubos teste foram constituídos dos seguintes reagentes: DL-BAPNA 200 μ L, tripsina 20 μ L a uma concentração de 0,05 mg/mL e 20 μ L dos inibidores, previamente diluídas em tampão NH_4HCO_3 0,01M pH 8,5. O tubo branco foi constituído de 200 μ L de substrato e 140 μ L de água, enquanto que o tubo controle de atividade enzimática continha 200 μ L de substrato, 20 μ L de enzima e 20 μ L de água.

Os tubos de reação foram homogeneizados em vórtex e incubados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 40 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 250 μ L de ácido acético 60% (v/v) e a atividade enzimática quantificada pela medida da absorvância a 410nm. Para obter medidas confiáveis da atividade inibitória, ou seja, valores de absorvância consideravelmente maiores que o ruído do equipamento, as preparações de inibidores foram previamente diluídas em série para obter inibição entre 40 e 60% da atividade da tripsina. Posteriormente, as percentagens de inibição foram multiplicadas pelo fator de diluição para a determinação atividade inibitória, e divididas pela concentração para normalização dos resultados.

4.7.2. Cálculo da Atividade Inibitória (AI):

Fator de diluição de uma solução de amostra que inibiu entre 40 e 60% as enzimas, multiplicado pela porcentagem de inibição* obtida, normalizada pela concentração de proteínas em mg/mL.

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

AEI = Absorvância a 410nm da fração correspondente a aproximadamente 50% de inibição da atividade enzimática (inibidor + enzima + substrato)

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

Os valores finais foram transformados em Unidades de Atividade Inibitória Normalizada (UAIN).

1 UAIN equivale a 1.000.000 AI.

4.8. Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóica de *Gallusgallus domesticus*

A atividade angiogênica dos inibidores foi avaliada empregando o ensaio da membrana corioalantóica de galinha (CAM) descrito por Auerbach e colaboradores em 1974.

Ovos de galinha embrionados foram obtidos no comércio local e sua superfície higienizada com auxílio de uma esponja seca para remoção de quaisquer dejetos presentes. Os ovos foram incubados em chocadeira Brasmatic® 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 em cada ovo (n=12) 7 µL/dia da substância a ser testada, por um período de cinco dias consecutivos, com doses que variaram entre 7000 a 0,07 pMoles. No

décimo quarto 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 (Vimicrocorp.).

4.8.1. Quantificação do número de bifurcações dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóica

Após o registro fotográfico, as imagens contendo 6 cm² foram divididas em 144 quadrantes de 0,5 cm² e analisadas com auxílio do software Adobe Photoshop®. Foram escolhidos aleatoriamente 10 quadrantes (representando aproximadamente 10% da área total da imagem) e as bifurcações dos vasos sanguíneos foram quantificadas. Como critério de exclusão, foram eliminados os quadrantes apresentando artefatos, vasos de calibre superior a três milímetros, preenchimento incompleto do quadrante, ou ainda áreas com baixa resolução.

4.9. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o software *Graph Pad Prism* (Versão 5.0). Para os dados que não assumem a distribuição gaussiana utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* seguido de pós-teste de *Dunns*. Para os dados que assumem a curva gaussiana, empregou-se o teste ANOVA *one-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Adotou-se o nível de significância $p \leq 0,05$ para todas as análises.

Resultados

5. Resultados

5.1. Preparação dos inibidores

5.1.1. Purificação de BBI

Para ilustrar a necessidade de purificar o BBI, a eletroforese de uma amostra da preparação de BBI obtida de acordo com o método de Yavelow e colaboradores (1985) é mostrada na figura 07, demonstrando claramente a presença de vários contaminantes apesar da constatação da banda de massa molecular correspondente ao BBI na região de 8 kDa. Preparações como essa, foram amplamente utilizadas na década de 80 em estudos de quimioprevenção e avaliações da atividade antitumoral do BBI.

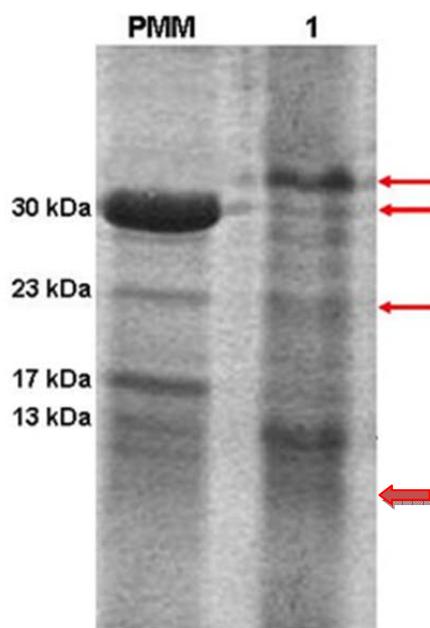


Figura 7: Perfil eletroforético (15% SDS-PAGE) do BBIC obtido pelo método descrito por Yavelow e colaboradores (1985). Legenda: PPM, Padrão de massa molecular (ConA); Linha 1: BBIC. As três primeiras setas vermelhas indicam a presença de proteínas com peso molecular próximos a 23 e 30 kDa enquanto a última seta vermelha indica a posição de 8 kDa referente ao peso molecular do BBI.

5.2. Purificação do inibidor Bowman-Birk

Os procedimentos pré-estabelecidos pelo nosso laboratório para o enriquecimento por meio de etapas de precipitação, foram essenciais para se obter a obtenção do material em fase adiantada de isolamento. A cromatografia

de troca iônica com a coluna Q. Sepharose foi empregada como etapa adicional a fim de obtermos um enriquecido de BBI com maior grau de pureza (figura 7), o qual foi empregado posteriormente nos testes da atividade antiangiogênica. Como visto na figura 8 essas etapas garantiram a obtenção o de um material com um grau de pureza e enriquecimento satisfatórios.

Analisando o cromatograma do gráfico 1 é possível verificar 4 picos principais com o aumento da concentração de NaCl. Por meio de ensaios de atividade inibitória de tripsina, foram identificadas frações contendo o inibidor de forma mais intensa na fração 0,2 M e em menor proporção em 0,3 M de NaCl. Pela análise do perfil cromatográfico podemos constatar uma evolução na purificação do BBI e um elevado enriquecimento da fração 0,2M.

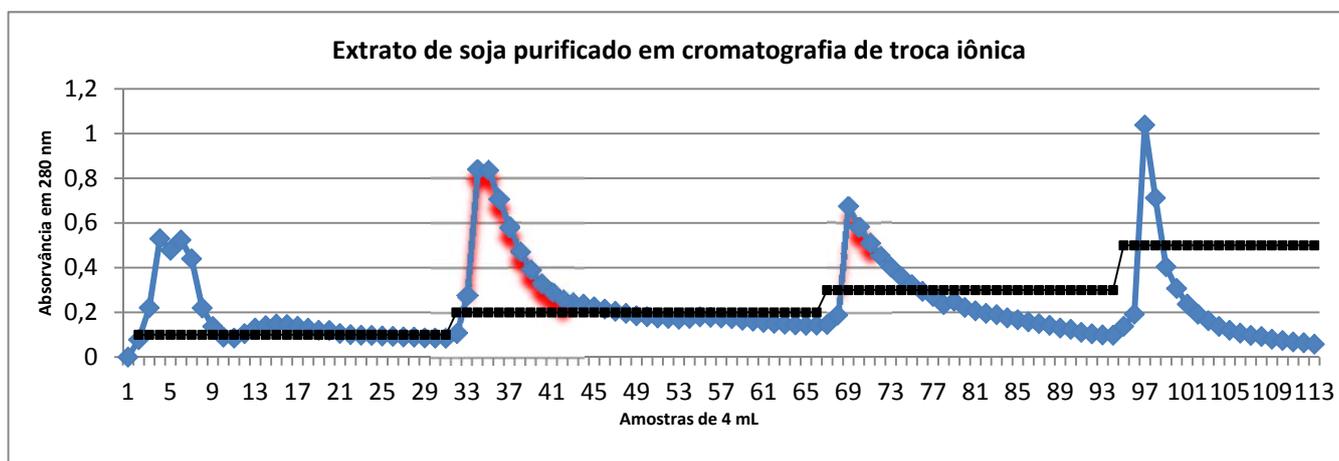


Gráfico1. Cromatograma em 280nm e medidas de atividade antitripsina de extrato de soja eluído em cromatografia de troca aniônica (Q. sepharose). A linha em preto indica a variação de gradiente salino de 0,1M; 0,2M; 0,3M & 0,5M de NaCl . A linha azul indica a absorvância das amostras de 4mL coletadas em tubos de ensaio. As regiões marcadas em vermelho no grafico indicam as amostras que apresentaram atividade antitripsina analisadas em ensaio enzimático.

Com o intuito de avaliar as frações da cromatografia do ponto de vista da composição proteica foi realizada uma análise por SDS-PAGE. Observando-se o gel (figura 8) fica claro que o processo de purificação gerou a fração 0,2 M extremamente enriquecida no componente de massa molecular de 8 kDa e dotado de atividade inibitória, tanto para tripsina quanto para quimotripsina. Essas análises nos permitiram concluir que a preparação obtida é constituída essencialmente de BBI e que, não foram observadas na eletroforese bandas nas regiões correspondentes a 5 e 14 KD. Essa observação descarta a possibilidade da presença de uma contaminação apreciável de lunasina. Além do mais, considerando as propriedades iônicas dessa proteína, de acordo com Dia *et al* (2009), não seria

esperada a presença dessa proteína na fração 0,2M, pois em pHs inferiores ao que utilizamos para a cromatografia, a lunasina seria deslocada de uma coluna aniônica em concentrações de NaCl superiores a 0,5M. Desta maneira, a preparação obtida da fração 0,2 M foi considerada satisfatória para a avaliação da atividade antiangiogênica.

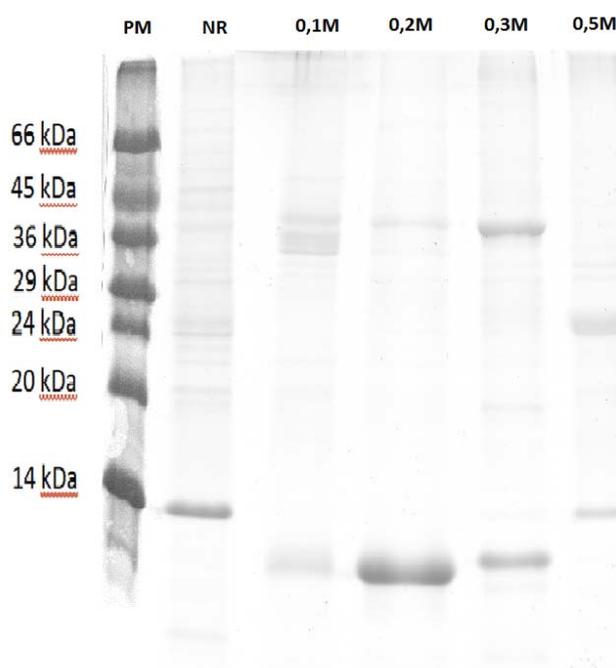


Figura 8: Gel de poliacrilamida 15% (BBI). Primeira coluna da esquerda é referente ao peso molecular que varia de 66 kDa a 14 kDa. As cinco canaletas seguintes são referente a seções com: NR – Fração não retida e gradientes de sal entre 0,1 – 0,5 molar de NaCl para desligamento das moléculas.

5.3. Purificação do Inibidor de *Cucurbita maxima*(CMTI)

O método mais difundido na literatura para a purificação do inibidor de abobora (CMTI) consiste no fracionamento do extrato total por meio de cromatografia de afinidade em colunas de tripsina imobilizada segundo Hang, *et al* (1999) & Laure, *et al* (2006). A coluna utilizada nesse trabalho foi confeccionada no nosso laboratório segundo a técnica de Matsumoto *et al.*, (1979). Essa apresenta aproximadamente 5 mg de tripsina imobilizada por g de gel drenado por filtração à vácuo. A purificação através desse método leva a obtenção de um produto final em apenas duas etapas de isolamento, a centrifugação a 1200 g e a purificação em

cromatografia de afinidade, o que é muito bom por encurtar o tempo para utilização do inibidor.

Pelo fato de o extrato total utilizado inicialmente ser muito rico, utilizamos o tampão bicarbonato como etapa inicial no processo de purificação a fim de proceder uma limpeza previa da coluna. Através dos dados obtidos foi possível observamos o deslocamento de uma grande quantidade impurezas nas frações iniciais de limpeza com o tampão, porém sem nenhuma atividade antitripsina (dados não apresentados). Com a intenção de garantirmos a pureza do inibidor de interesse, utilizamos o NaCl (em tampão bicarbonato) para o tratamento e retirada de proteínas que possam ter interagido com a coluna cromatográfica através de ligações iônicas, sabendo que esse tampão dificilmente influenciaria a interação entre o inibidor de abóbora e a tripsina imobilizada, causando seu deslocamento. Monitoramos o deslocamento do inibidor através de ensaios de atividade antitripsina, feito em todas as frações colhidas e observamos a presença do inibidor apenas nas frações deslocadas com ácido clorídrico, o que condiz com as expectativas de obtenção desse método, no qual utilizamos uma cromatografia de afinidade com ligação específica para proteínas que se ligam á tripsina, como é o caso do inibidor CMTI. Apesar disso, verificou-se a presença de espécies ligantes à coluna destituídas de atividade inibitória em frações posteriores ao inibidor. Sendo assim a fração isolada foi submetida à eletroforese.

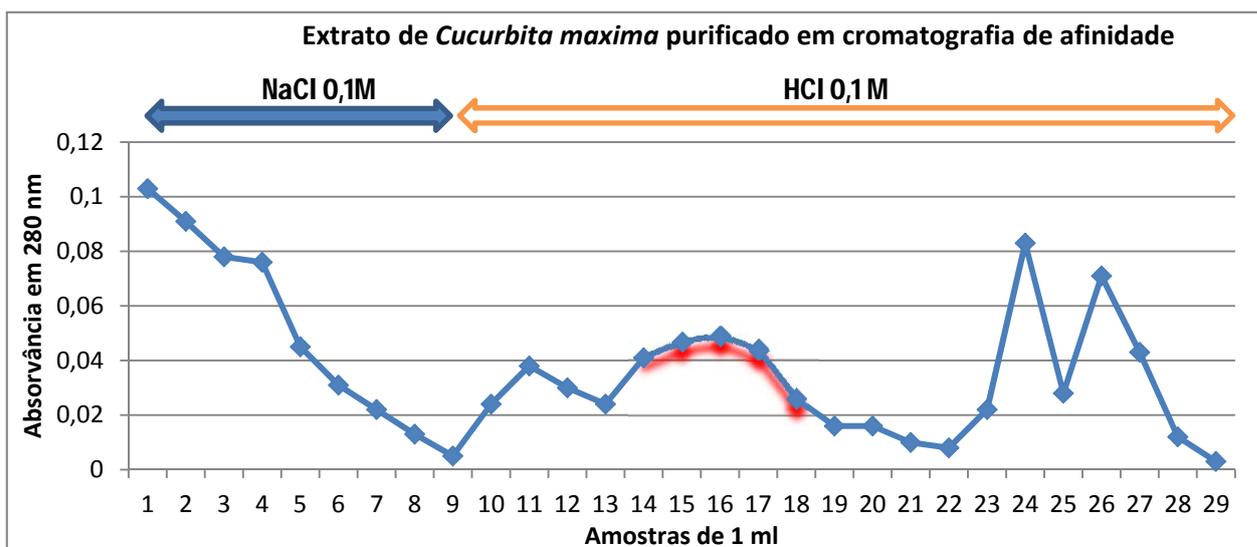


Gráfico 2: Cromatograma em 280 nm das frações deslocadas com NaCl 0,1M e HCl 0,1M. Amostras de 1mL foram coletadas em tubos de ensaio. Em **vermelho** destaca-se as amostras que obtiveram atividade antitripsina analisadas em ensaio enzimático.

Com o intuito de avaliar as frações da cromatografia do ponto de vista eletroforético foi realizado o SDS-PAGE das frações obtidas. Pela análise do gel fica claro que o processo de purificação gerou a fração 0,1 M contendo componentes de massa molecular de mais ou menos 3 kDa e dotado de atividade inibitória para tripsina. Uma banda na região de 7 kDa foi observadas na eletroforese, o que corrobora com os dados de Jasèkiewicz, *et al* (1998), que cita a existência de uma isoforma do CMTI com maior peso molecular. Essas análises nos permitiram concluir que a preparação obtida é constituída essencialmente de CMTI e descarta a possibilidade da presença de uma contaminação apreciável de proteínas de alto peso molecular.

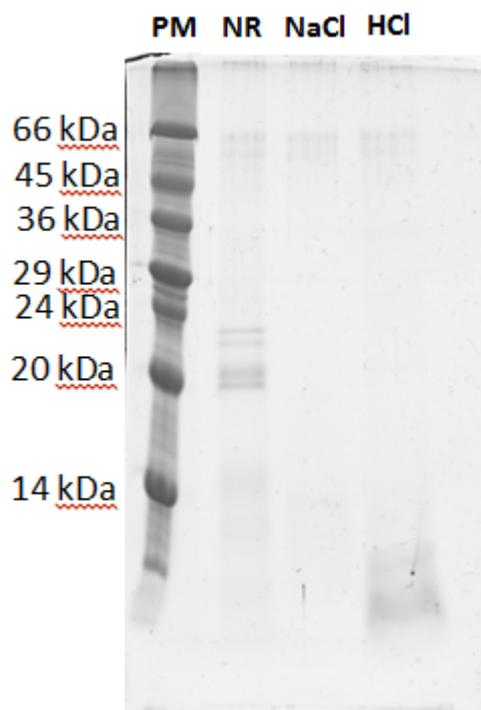


Figura 9: Gel de poliacrilamida 15% (CMTI). Primeira coluna da esquerda é referente ao peso molecular que varia de 66 kDa a 14 kDa. As três canaletas seguintes são referente aseluições com: BA – Bicarbonato de Amônio, NaCl e HCl.

De acordo com Thaimattam, *et al* (2002) o CMTI é considerado como um dos inibidores mais potentes de tripsina, pois apresenta um k_i de $3,2 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$. Entretanto sua uma atividade específica foi aproximadamente três vezes menor que a do BBI purificado por cromatografia de troca iônica (tabela 3).

Por outro lado o inibidor CMTI apresentou maior atividade quando comparado com o inibidor BBI purificado em cromatografia de afinidade. De acordo com Laure, *et al* (2006) e Huang, *et al* (1999), que utilizaram essa técnica na purificação do CMTI, apesar de ocorrerem hidrólise de alguns aminoácidos e perdas de algumas argininas na porção N-terminal do inibidor, não há modificação da porção da molécula envolvida na atividade antitripsina. Desta forma, apesar da menor atividade em relação ao BBI purificado em troca iônica, avaliamos a atividade antiangiogênica da preparação de CMTI, obtida em cromatografia de afinidade, em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*.

Tabela 3: Valores de atividade inibitória referente aos inibidores purificados em cromatografia de troca iônica e afinidade

Inibidor	Atividade Especifica (UAIN)
BBI (Troca iônica)	1338
CMTI (Afinidade)	480
BBI (Afinidade)	71

5.4. Purificação e caracterização dos peptídeos análogos aos domínios inibitórios do BBI de soja

Os inibidores YCT e YCA foram propostos pelo fato de serem análogos aos domínios inibitórios do BBI de soja e por apresentarem maior atividade e resistência à hidrólise pela tripsina e quimotripsina de acordo com Gariani, *et al* (1999) & McBride, *et al* (1996). A síntese dos peptídeos foi feita em fase sólida empregando-se a estratégia Fmoc estabelecida por Merrifield (1963). O produto foi purificado em cromatografia de fase reversa (C-18) e analisada por espectrometria de massa no espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF com fonte de ionização do tipo *electrospray*, conforme pode ser visto nos perfis cromatográficos da figura 10 e 11. Os peptídeos obtidos apresentaram um único componente principal que foi analisado pela espectrometria de massas *electrospray QIT (ion trap) – TOF(time of flight)*. A figura 10 apresenta os perfis cromatográficos dos peptídeos cíclicos análogos aos domínios inibitórios do BBI de soja purificados em sistema HPLC, destacando-se os picos correspondentes ao peptídeo.

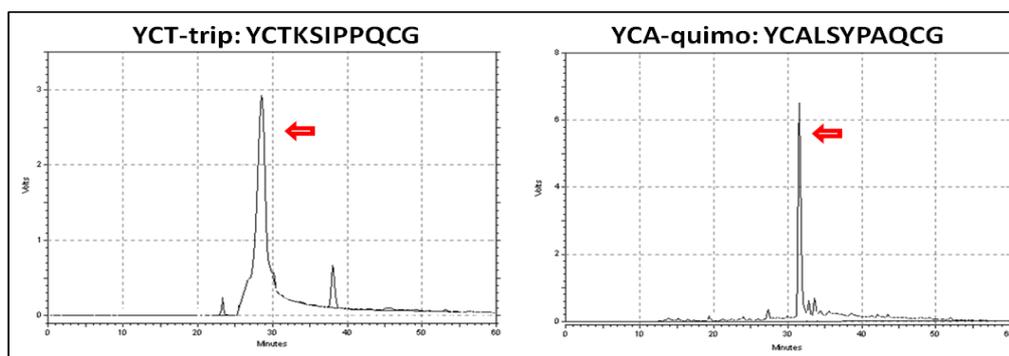


Figura 10: Perfis cromatográficos em sistema HPLC dos peptídeos cíclicos sintetizados (fase estacionária: coluna C18 - 250 mm x 10mm – Lichrocart 250-10 Purospher). Foi empregado gradiente de ACN variando de 25 a 60% em 65 minutos e TFA 0,1% durante 30 minutos sob um fluxo de 1mL/min.

Os valores de massa molecular corrigidos, encontrados no modo *electrospray* positivo [ES m/z : $(M + H)^+$], estão apresentados na Tabela 4. Os resultados foram condizentes com o valor teórico esperado, predito pela ferramenta *ExPASy – Compute PI/Mw tool*, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas e seu grau de pureza.

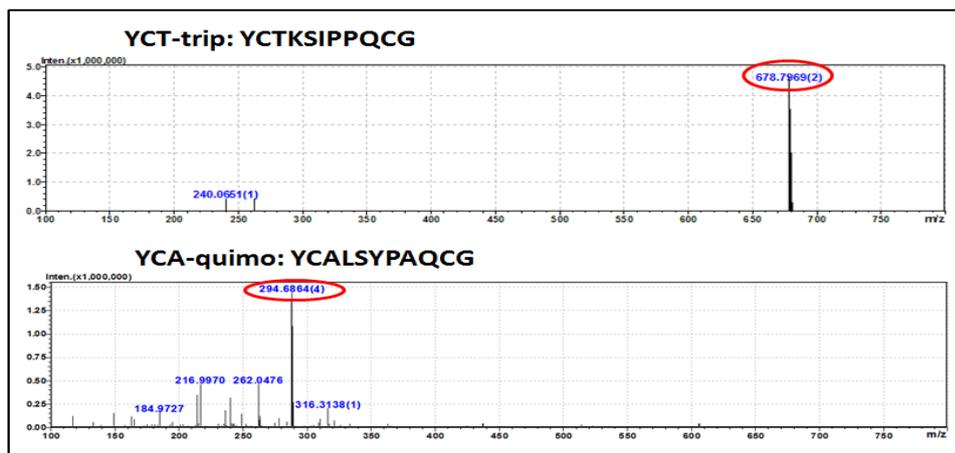


Figura 11: Espectros de massas obtidos por LCMS-IT-TOF do tipo *electrosray* dos peptídeos inibidores cíclicos YCT-trip e YCA-quimo. Os picos destacados apresentam a relação massa/carga (m/z) referente ao peptídeo com a massa molecular esperada

Tabela 4: Valores de massa molecular encontrados por análise em LC-MS.

Peptídeo	Massa molecular (g/mol)^a	ES m/z ($M+H$)⁺ ^b
YCT-trip	1.356,6	1.355,59
YCA-quimo	1.174,34	1.174,75

^aValor teórico obtido através do software ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/) e corrigido pela subtração de 1 Da no valor final da massa molecular, devido à utilização da Resina RinkAmide para a síntese, de forma que os peptídeos são obtidos com a extremidade C-terminal na forma amidada.

^b Valor encontrado por espectrometria de massas e corrigido pela subtração da carga positiva adquirida durante a ionização, de acordo com as figuras 10 e 11.

Esses produtos sintéticos, purificados e analisados, foram utilizados posteriormente para a análise de atividade antiangiogênica. A avaliação da atividade antiangiogênica dos peptídeos tem como objetivo comprovar que essa atividade está vinculada ao seu potencial inibitório sobre as enzimas proteolíticas.

6. Resultados referentes aos ensaios antiangiogênicos

6.1. Atividade antiangiogênica de inibidores de tripsina em membrana de *Gallus domesticus*

Serino proteases são importantes alvos de ação na carcinogênese e foram investigadas empregando-se o BBI como inibidor. Entretanto poucos trabalhos foram realizados com os domínios inibitórios para tripsina e quimotripsina isoladamente. (Clemente *et al.*, 2010). A caracterização da ação de cada domínio inibitório específico pode ser um grande passo para a compreensão do mecanismo molecular.

Alguns grupos de pesquisa como o de Sathler *et al.*, (2009) & Borgoño *et al.*, (2007), focaram seus estudos nos diversos inibidores de serino proteases encontradas em plantas, microrganismos e até mesmo inibidores sintéticos. Um bom exemplo é o trabalho feito com a ecotina, um inibidor de tripsina e quimotripsina, de peso molecular de aproximadamente 38 kDa, isolada de *E. coli*, que é resistente a fervura e estável em pH 1,0. Esse inibidor apresentou um alto potencial como agente antitumoral, diminuindo o crescimento e diferenciação do tecido tumoral em cultura de células de câncer de próstata de ratos (Sathler *et al.*, 2009). Acredita-se que o mecanismo de ação de inibidores como a ecotina seja realmente inibir a ação de serino proteases como a u-PA. A u-PA, assim como outras serino proteases conhecidas presente na circulação, ativa processos importantes como a cascata de coagulação, a degradação da membrana basal e da matriz extracelular, se colocando presente no crescimento e diferenciação dos tecidos tumorais, essa inibição da u-PA tem como resultado final a redução do processo de crescimento e metástase do tecido tumoral (Takeuchi *et al.*, 1999).

Considerando os mecanismos descritos acima, envolvidos na degradação de matriz extracelular durante a angiogênese e os efeitos antiangiogênicos de inibidores dessas proteases, decidimos então testar a influencia de diferentes inibidores de serino proteases, isolados de sementes e sintéticos, na atividade angiogênica. Foram realizados ensaios avaliando a atividade angiogênica em membranas de *Gallus domesticus* com o inibidor BBI e CMTI purificados como descritos nos tópicos acima, além de cabeças sintéticas análogas aos domínios

inibitórios para tripsina e quimotripsina do BBI e também com a pentamidina, um fármaco capaz de inibir tripsina.

6.1.1. Ensaio Antiangiogênico do inibidor Bowman-Birk

Para a quantificação da atividade antiangiogênica realizamos os ensaios com doses de inibidores que variaram de 7000 pmols até 0,7 pmols, aplicados diretamente ao longo de 5 dias consecutivos na membrana coreoalantóica, e por fim essas foram fotografadas e as ramificações de vasos sanguíneo (brotos) foram contadas. As medidas foram apresentadas como angiogênese relativa ao controle, considerando-se o controle 100% da formação de vasos sanguíneos.

Atividade antiangiogênica dos inibidores Bowman-birk

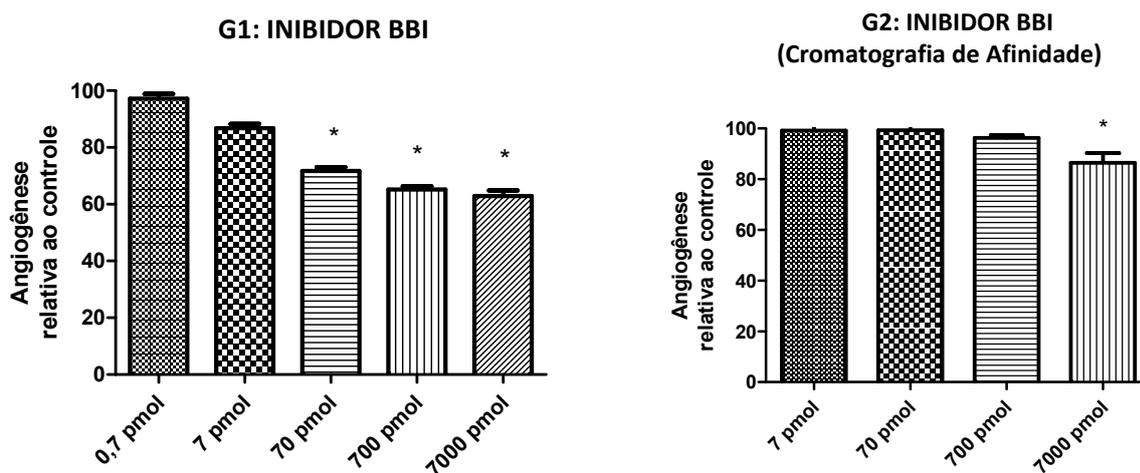


Gráfico 3: Atividade anti-angiogênica dos inibidores de tripsina (BBI) nas concentrações de 7000 pmol à 0,7 pmol. *atividade inibitória significativamente diferente em relação ao controle positivo ($p \leq 0,05$). G1: gráfico referente ao BBI purificado em cromatografia de troca iônica; G2: Gráfico referente ao BBI purificado e cromatografia de afinidade (tripsina).

O gráfico 3 apresenta os resultados relacionados ao Inibidor Bowman-Birk purificado em cromatografia de troca iônica (G1): é possível observar que ele apresentou capacidade de inibir a formação de vasos sanguíneos, com diferença estatística em relação ao controle, nas concentrações de 7000 pmols até 70 pmols (Gráfico 3: G1). Nas concentrações abaixo de 70 pmols de inibidor não foi observada uma diferença estatística em relação ao controle, embora seja possível ver que nas

concentrações de 70 e 7 pmols que ainda ocorre uma notável inibição de formação vascular.

O extrato enriquecido correspondente ao conteúdo purificado em etanol e submetido a cromatografia de afinidade, também foi testado quanto a sua atividade antiangiogênica. Observa-se a perda quase total da atividade antiangiogênica (Gráfico 3: G2). Levando em conta o resultado referente às atividades específicas dos inibidores, vista na tabela 3, essa queda na atividade antiangiogênica ocorreu provavelmente pela hidrólise do domínio inibitório de tripsina e partes da estrutura da molécula pelo contato com a tripsina imobilizada na coluna. Podemos observar uma ligeira atividade na concentração de 7000 pmols, que pode estar ligada a outros fatores da molécula, entre eles a atividade dos domínios inibitórios anti-tripsina ou a atividade residual do próprio domínio anti-tripsina.

A inibição correspondente a maior dose, pode ser facilmente percebida pela apreciação qualitativa das imagens das membranas controle e teste tratadas com BBI (figura 12).

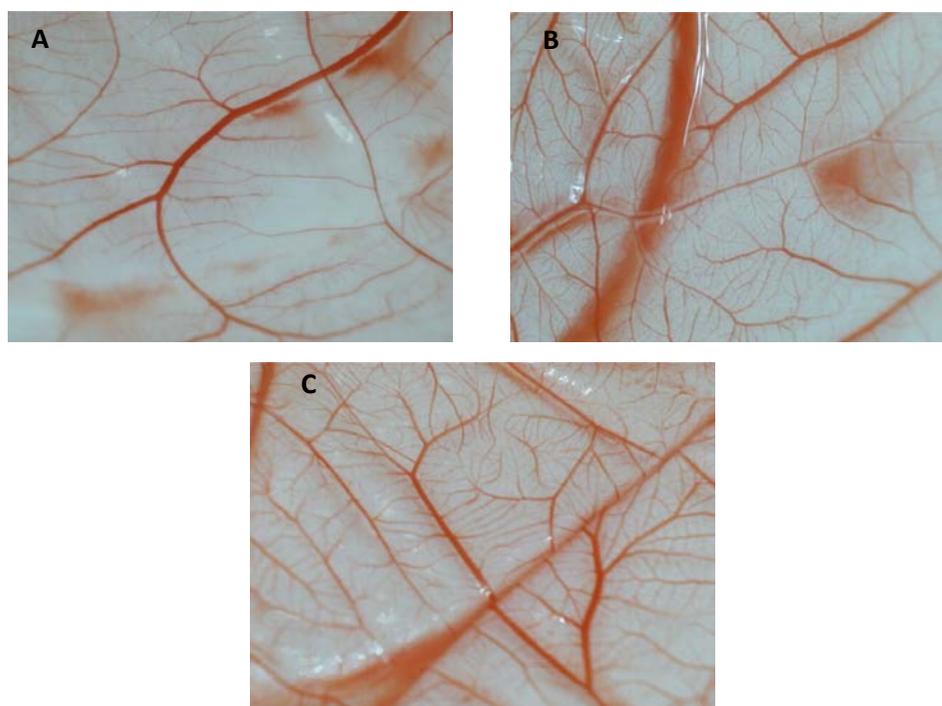


Figura 12: Membranas corioalantóicas após inoculação tópica de cinco doses diárias do inibidor BBI: A: 7000pmols; B: 7000pmols (cromatografia de afinidade); C: controle negativo

6.1.2. Ensaio Antiangiogênico de peptídeos sintéticos

Ao longo de 3 décadas de investigação da atividade preventiva do câncer com BBI e estudos dos possíveis mecanismos envolvidos, não foram realizados experimentos utilizando peptídeos sintéticos correspondentes à porção ativa da molécula, a maioria dos trabalhos emprega um enriquecido proteico, esse enriquecido possui contaminantes que podem eventualmente produzir efeitos que venham interferir na avaliação da atividade desse inibidor. A utilização dos peptídeos sintéticos afasta a possibilidade de ação de contaminantes e garante que os resultados obtidos sejam estritamente relacionados aos domínios ativos do inibidor, além de poder apresentar uma melhora na disponibilidade dos agentes antiangiogênicos, devido ao seu tamanho reduzido, resultando em maior atividade biológica.

Os ensaios em membrana coreoalatóica, referente aos peptídeos sintéticos, foram realizados da mesma maneira que os ensaios para o inibidor nativo, BBI, tornando possível a comparação dos resultados das preparações.

Atividade antiangiogênica dos inibidores sintéticos

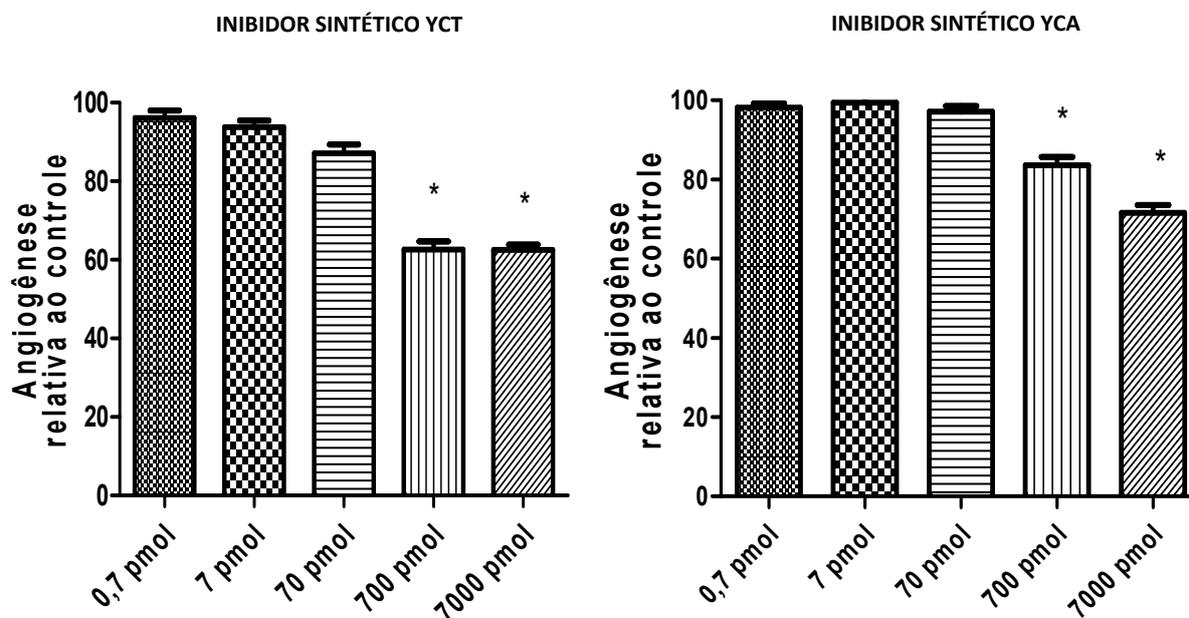


Gráfico 4: Atividade anti-angiogênica dos domínios inibitórios sintéticos referentes à inibição de tripsina e quimotripsinado BBI nas concentrações de 7000 pmol à 0,7 pmol. *atividade inibitória significativamente diferente em relação ao controle positivo ($p \leq 0,05$).

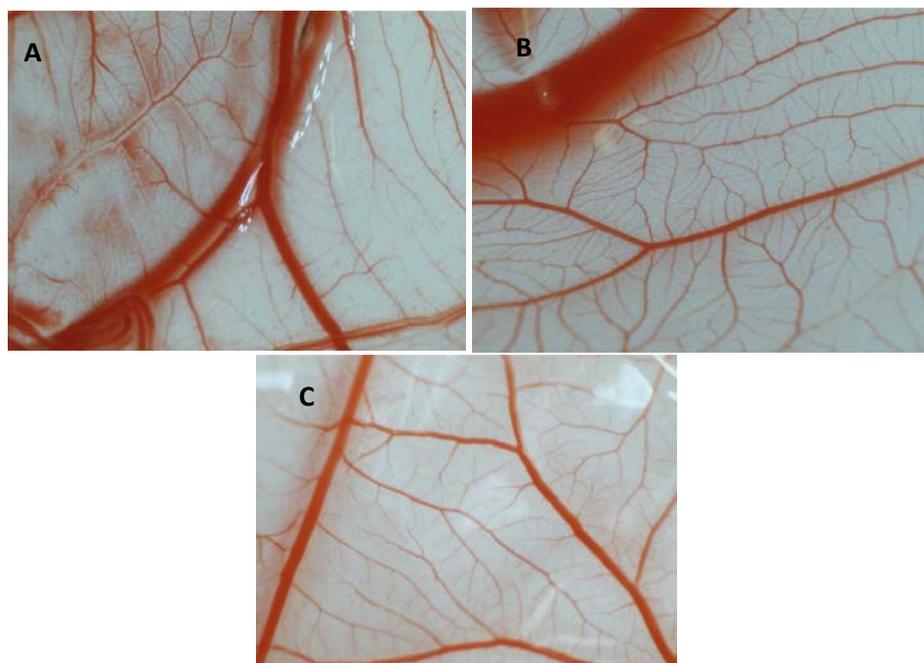


Figura 13: Membranas corioalantóicas após inoculação tópica de cinco doses diárias de 7 μ L de inibidores sintéticos de tripsina: A: YCA - 7000 pmols ; B: controle negativo e C: YCT - 7000 pmols.

Analisando o gráfico 4 verificamos que os peptídeos sintetizados apresentaram atividade antiangiogênica significativa em relação ao controle nas doses de 7000 e 700pmols, embora seja perceptível uma tendência na redução atividade antiangiogênica na dose de 70 pmols ela não apresentou diferença estatística em relação ao controle.

O resultado visto no gráfico 4 demonstrou que não houve a melhora antiangiogênica esperada referente a maior disponibilidade dos domínios sintéticos no tecido, o que pode ser observado comparando estes resultados com os do BBI purificado, isso pode sugerir uma maior susceptibilidade de degradação dos domínios inibitórios quanto testados *in vivo*, visto que a estrutura molecular do inibidor não esta completa o que pode facilitar o ataque das proteases do tecido. De forma positiva os domínios sintéticos foram responsáveis por inibir a angiogênese, mostrando que quando ativos são muito importantes e devem ser investigados. Sendo assim, o efeito de inibição dos domínios atuando em conjunto pode ser o que determinaria o efeito antiangiogênico total visto no Gráfico 3: G1. Este resultado fortalece a hipótese da perda quase total da atividade antiangiogênica vista no Gráfico 3: G2, no qual, mesmo com a hidrólise do domínio inibitório de tripsina o outro domínio responsável por inibir a quimotripsina pode ainda se manter agindo fracamente.

O domínio inibitório de tripsina tem um mecanismo muito explorado e citado pela literatura (Miyata *et al.*, 1998 & Yamashita *et al.*, 2003). Por outro lado, o sítio inibitório de quimotripsina é reconhecido como o responsável por maior parte do efeito preventivo do câncer induzido quimicamente, apesar de apresentar atividade antiangiogênica semelhante ao peptídeo sintético inibidor de tripsina.

6.1.3. Ensaio Antiangiogênico do Inibidor de *C. maxima*(CMTI)

Diante da vasta disponibilidade de inibidores potentes de tripsina encontrados na natureza, optou-se pela escolha e avaliação da atividade antiangiogênica de proteínas de menor massa molecular e dotadas de boa resistência à degradação. Nesse sentido os inibidores CMTI isolados de sementes de abóbora (*C. máxima*), apresentaram ótimas características, os dados na literatura indicaram que eles são os menores inibidores de tripsina conhecidos com cadeia peptídica de 27 a 34 resíduos de aminoácidos e 3 pontes dissulfeto, que mantêm sua estrutura secundária dos inibidores rígida e ativa (Krishnamoorthil, Gong & Richardson; 1990), além de uma constante de inibição, testada em inibidores recombinantes, de aproximadamente $3,2 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$ para tripsina bovina (Thaimattam *et al.*, 2002).

O CMTI inibe a tripsina assim como o BBI, porém apresentando uma massa molecular de 3kDa e atividade inibitória muito maior que a dos inibidores conhecidos hoje em dia. A purificação desse inibidor foi feita em cromatografia de afinidade como mostrado no item 5.2., foi aplicado em membrana coreoalantóica de *Gallus domesticus* e quantificada as ramificações (brotos) de vasos sanguíneos assim como feito para os outros inibidores.

Atividade antiangiogênica do inibidor CMTI

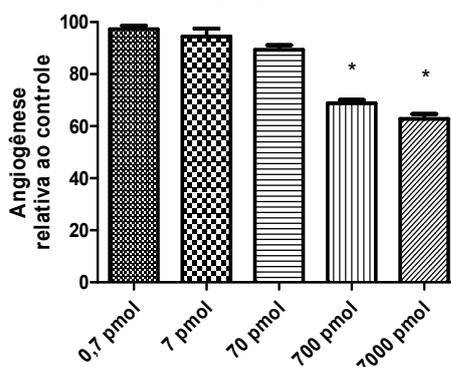


Grafico 5: Atividade anti-angiogênica do inibidor de tripsina de *Cucurbita maxima*(CMTI) nas concentrações de 7000 pmol à 0,7 pmol. *atividade inibitória significativamente diferente em relação ao controle positivo ($p \leq 0,05$).

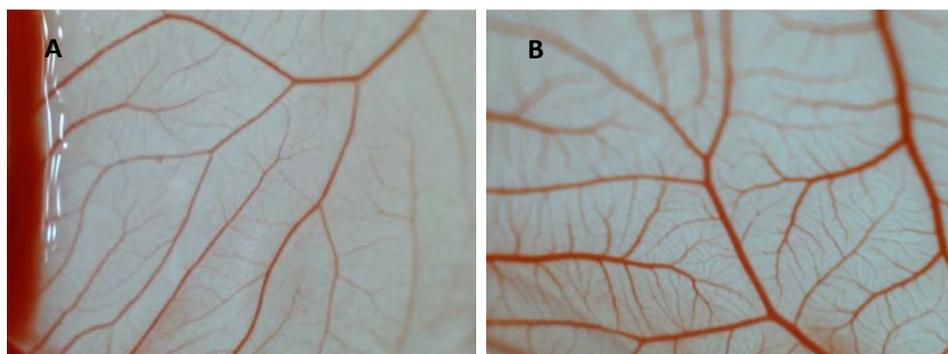


Figura 14: Membranas corioalantóicas após inoculação tópica de cinco doses diárias de 7 µL CMTI de abóbora: A: 7000pmols; B: controle negativo

Contrariando as nossas expectativas de uma melhor atividade antiangiogênica por parte do inibidor de abóbora, em experimento *in vivo*, não observamos o efeito inibitório esperado. O resultado mostrado no gráfico 8, apresenta uma inibição branda em 70 pmols, porém apenas nas doses de 7000 pmols e 700 pmols o inibidor apresentou atividade antiangiogênica significativa em relação ao controle. Esse resultado provavelmente está ligado aos dados de atividade específica antitripsina vista na tabela 3, que demonstra uma atividade reduzida do CMTI purificado em cromatografia de afinidade em comparação com BBI purificado em troca iônica. Pelo fato de não terem sido feitas todas as avaliações referentes ao estado de integridade da molécula, temos ciência que é necessário procedê-las para confirmarmos se a atividade antiangiogênica estava realmente reduzida, juntamente com a atividade antitripsina, ou se este é o efeito total do inibidor. Apesar de ser um resultado diferente do esperado podemos considerá-lo um resultado positivo, visto que o outro inibidor BBI ao ser purificado da mesma forma foi destituído de praticamente toda sua atividade antitripsina e antiangiogênica, porém se faz necessário obter novas formas de purificação do inibidor CMTI, o que nos permitirá entender melhor o quanto a cromatografia de afinidade influencia na atividade antitripsina e antiangiogênica do inibidor. Levando em conta que estamos trabalhando com um modelo embrionário muito angiogênico, fica claro que mesmo ocorrendo hidrólise do inibidor e em concentrações menores de aplicação, esse se mostrou capaz de frear o crescimento vascular.

6.1.4. Ensaio antiangiogênico da Pentamidina

A pentamidina é um medicamento, que apresenta em sua estrutura química duas benzamidas ligadas por uma cadeia alifática de cinco carbonos, muito eficaz

no combate a doenças causadas por protozoários (Parker *et al.*, 1993). Foram associadas a ela descobertas a respeito da sua utilização como medicamento para tratamento anticarcinogênico (Markowitz *et al.*, 2004). A especificidade da tripsina e enzimas da cascata da coagulação por resíduos de arginina e lisina, que também ocorrem em muitos inibidores naturais, motivou a síntese de diversos inibidores como a benzamidina e a pentamidina. A benzamidina possui em sua estrutura o grupo guanidino responsável pela ligação no sítio S₁ da tripsina, permitindo a interação e proporcionando a inibição. Entretanto poucos estudos de interação entre pentamidina e as serino proteases foram realizados, mas essa droga apresenta maior afinidade pela tripsina do que a benzamidina (Perilo *et al.*, 2010). Considerando a atividade inibitória da pentamidina sobre a tripsina e sendo essa uma droga que apresenta maior alcance e difusão pelos tecidos do que inibidores proteicos, a avaliação da atividade antiangiogênica, ainda não explorada pela literatura pode representar uma importante informação a respeito das especulações sobre os possíveis mecanismos antitumorais dessa droga. O trabalho de Smith *et al.*, (2010) destacou que a pentamidina possui efeito importante principalmente no tratamento do melanoma, através do impedimento de ligação de duas proteínas a S100B e a p53. Devido a sua capacidade de tratamento do câncer, e sabendo que a estrutura molecular desse inibidor possibilita a inibição de tripsina-símile, resolvemos testa-lo em membrana coreoalantóica de *Gallus domesticus* para entender se ele além de atuar inibindo ligação de proteínas, pode também inibir o crescimento vascular, pela inibição de proteases, assim como acontece nos outros inibidores testados nesse trabalho, potencializando seu efeito antitumoral.

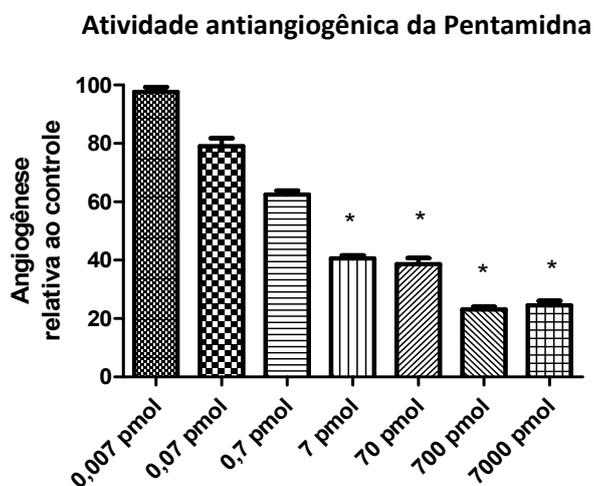


Gráfico 6: Atividade anti-angiogênica da pentamidina nas concentrações de 7000 pmol à 0,007 pmol. *atividade inibitória significativamente diferente em relação ao controle positivo ($p \leq 0,05$).

Os resultados apresentados no gráfico 7 comprovam que a pentamidina possui realmente uma enorme atividade antiangiogênica. A inibição do crescimento vascular observado em relação ao controle foi significativo até a concentração de 7pmols, e continuando com atividade muito maior que a dos outros inibidores testados até a concentração de 0,07 pmols. Este resultado nos possibilita vincular a inibição de enzimas semelhantes à tripsina à inibição da angiogênese, embora outros efeitos, que podem resultar em uma resposta antiproliferativa, devem ser considerados. Uma busca de artigos no banco de dados do “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>” revela que embora essa droga seja utilizada há mais de quatro décadas, existe um grande interesse pelos mecanismos de ação antitumoral, mas não foram encontrados registros de trabalhos que demonstram atividade antiangiogênica.

Embora a pentamidina apresente uma intensa resposta biológica, vários efeitos tóxicos foram apontados na literatura (Perilo *et al.*, 2010) que demonstram limitações no uso dessa droga. Por outro lado, o inibidor Bowman-Birk de soja e o inibidor CMTI de abóbora são considerados isentos de toxicidade em humanos, colocando esses inibidores, bem como seus análogos, como potenciais drogas antiangiogênicas.

O efeito da pentamidina apresentado no gráfico 7 é consistente com as atividades dos outros inibidores de tripsina, sob o aspecto da inibição da angiogênese, embora manifestado de maneira mais intensa, sugerindo que outros mecanismos podem estar relacionados. Observando os dados literários, acredita-se que grande parte dos efeitos provenientes da administração de pentamidina é atribuídos à sua capacidade de se ligar ao sulco menor do DNA e inibir a replicação e a síntese de proteínas (Hildebrandt *et al.*, 1998). Alguns estudos também apontam sua ação direta sobre enzimas envolvidas na reparação de danos no DNA, e ressaltam a possibilidade do seu uso como agente anticancerígeno (Chow *et al.*, 2004). Além disso, a pentamidina também inibe enzimas envolvidas na acetilação de histonas e clivagem de regiões alteradas do DNA (Kobayashi *et al.*, 2010).

Discussão

7. Discussão

Embora vários trabalhos produzidos na década de 80 tenham apontado o BBI como molécula responsável pelo excelente efeito protetor do câncer induzido quimicamente, grande parte dos trabalhos foram realizados com enriquecidos de soja (BBIC) segundo o método descrito por *Yavelow, et al (1985)*. Entretanto outras substâncias presentes nesse enriquecido também são apontadas como agentes quimiopreventivos do câncer. De acordo *Dia, et al (2010)* a lunasina tem sido considerada como um dos principais componentes quimiopreventivos do extrato de soja. Apresentou-se como proposta paralela a este trabalho a avaliação de uma possível atividade antiangiogênica da Lunasina, apoiado no potencial antiproliferativo já discutido na introdução. Os resultados demonstram uma inibição substancial do surgimento de brotos na membrana corioalantóica de *Gallus domesticus (Silva, F. V 2014)*. Por outro lado, a atividade inibitória do BBI sobre serino- proteases relacionadas à ativação do processo angiogênico poderia causar a inibição do desenvolvimento vascular. O BBI inibe a ativação de proteases envolvidas na degradação da membrana basal e matriz extracelular, como é o caso da serino-protease de membrana MT-SP1 (*Yamasaki et al., 2003*). Por outro lado, as metaloproteases MMP-2 e MMP-9 que têm sua expressão aumentada em alguns tumores e são dependentes de tripsina (*Duncan et al., 1998*). De acordo com *Bawadi e colaboradores (2004)* o BBI de soja inibe a ativação tripsina-dependente dessas duas metaloproteases envolvidas na angiogênese patológica.

O modelo de atividade angiogênica adotado nesse trabalho, devido a sua praticidade permitiu a avaliação quantitativa em ampla faixa de concentração das espécies de inibidores possibilitando uma avaliação comparativa da eficácia antiangiogênica de diferentes sítios moleculares do BBI, do inibidor de abóbora e da pentamidina.

Os resultados mostraram que os inibidores de tripsina, reduzem o desenvolvimento vascular de forma significativa e dentro da expectativa. A Pentamidina e o BBI demonstraram maior potencial antiangiogênico, com ênfase para a ação da pentamidina que inibiu consideravelmente a angiogênese em concentrações extremamente baixas. Embora ela tenha se mostrado toxica em concentrações elevadas alguns trabalhos como o de *Weinberg, A. et al . (1990)*

comprovam que aplicações da pentamidina diretamente no local da patologia podem evitar os efeitos colaterais, no artigo o autor cita a aplicação da pentamidina por inalação em pacientes com pneumonia causada pelo *P. carinii*, o tratamento foi bem tolerado por quase todos os pacientes comprovando a eficácia da aplicação direta. Por outro lado Parker *et al.* (1993) discutem que o tratamento com pentamidina, quando avaliada em concentrações acima de 5 µL aplicado de forma sistêmica, produz frequentemente reações adversas graves em humanos, diminuindo a taxa de crescimento e alterando a morfologia de hepatócitos. Enquanto trabalhos são produzidos tentando diminuir ou eliminar o efeito tóxico da pentamidina, o BBI, que também apresentou ótima atividade antiangiogênica, não apresentou nenhuma toxicidade, corroborando com os dados encontrados na literatura. Segundo Armstrong *et al.* (2000) o inibidor Bowman-Birk é considerado isento de toxicidade em humanos.

O inibidor CMTI e os peptídeos sintéticos do BBI, apesar de apresentarem boa atividade antiangiogênica se mostraram aquém do que esperávamos para as suas características, como o tamanho reduzido da molécula e capacidade inibitória elevada. A aplicação dos domínios sintéticos ocorreu principalmente a fim de eliminar contaminantes importantes como a lunasina, além de entender e avaliar melhor o funcionamento de cada uma das regiões específicas do inibidor. Acreditávamos também que a utilização de peptídeos sintéticos nos levaria a uma melhora substancial na difusão do agente antiangiogênico sobre o tecido, pelo fato de estarmos aplicando desta vez uma molécula muito menor que o inibidor nativo. Como visto nos resultados apresentados no gráfico 4, obtivemos uma perda na atividade antiangiogênica ao invés da melhora esperada. Isso pode ser explicado por estarmos testando uma molécula menor, sem sua estrutura nativa completa, favorecendo o ataque de proteases presentes no tecido, causando a hidrólise prematura do domínio inibitório. O fato de o BBI nativo funcionar com os dois domínios inibindo as proteases simultaneamente, certamente influenciou diretamente nos resultados dos inibidores sintético atuando separadamente, e culminando na perda de parte da atividade antiangiogênica observada inicialmente no inibidor nativo. Tais dados estimulam testes com a aplicação de maiores quantidades de peptídeos, promovendo assim a degradação da mesma quantidade de inibidor e obtendo um efeito antiangiogênico maior, ou a síntese dos domínios

inibitórios com regiões que possam impedir a fácil degradação por proteases do tecido.

Trabalhos publicados como os de Thaimattam, *et al.* (2002) & Kazmierczak, *et al.* (2003) atribuem ao CMTI uma constante de inibição elevada, de aproximadamente $3,2 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$ para tripsina bovina, porém alguns autores obtiveram o CMTI a partir da produção do inibidor recombinante, o que se torna viável devido ao seu tamanho reduzido, enquanto outros utilizaram a cromatografia de afinidade. Os nossos resultados referente ao inibidor CMTI, nesse trabalho, nos mostrou que mesmo ele tendo apresentado boa atividade antiangiogênica, se faz necessário testar outros métodos de purificação para esse inibidor, que podem resultar em uma atividade antitripsina e antiangiogênica maior do que as encontradas com a purificação em cromatografia de afinidade.

Analisando os resultados da atividade antiangiogênica dos dois inibidores nativos e suas formas de purificação, concluímos que a purificação do inibidor CMTI feita em cromatografia de afinidade, se mostrou nociva à molécula purificada, causando a hidrólise da região responsável pela inibição de tripsina de alguns inibidores presentes no extrato, o que tem como consequência uma perda na sua atividade antiangiogênica. Ao compararmos o BBI e o CMTI purificados em cromatografia de afinidade, o CMTI se mostrou mais resistente à hidrólise conservando parte da sua atividade inibitória e antiangiogênica. A perda total da atividade inibitória do BBI pelo tratamento em coluna de afinidade reforça as evidências que a atividade antiangiogênica é dependente da integridade molecular da região correspondente ao domínio inibitório que interagem com a tripsina (Gráfico 3: G1 & G2). Clemente *et al.*, (2010) discutem que, embora ainda não sejam completamente conhecidos os mecanismos pelos quais o BBI e os outros inibidores exercem suas funções anticarcinogênicas, suas habilidades intrínsecas como inibidores de serino proteases é fundamental, visto que os inibidores quimicamente inativados não tem efeito significativo na proliferação de células cancerígenas.

Para melhor entendermos resultados desse trabalho demonstrados na figura 15 os possíveis sítios de hidrólise da tripsina presentes em toda a estrutura dos inibidores nativos, BBI e CMTI, bem como seus respectivos domínios para a inibição da tripsina.

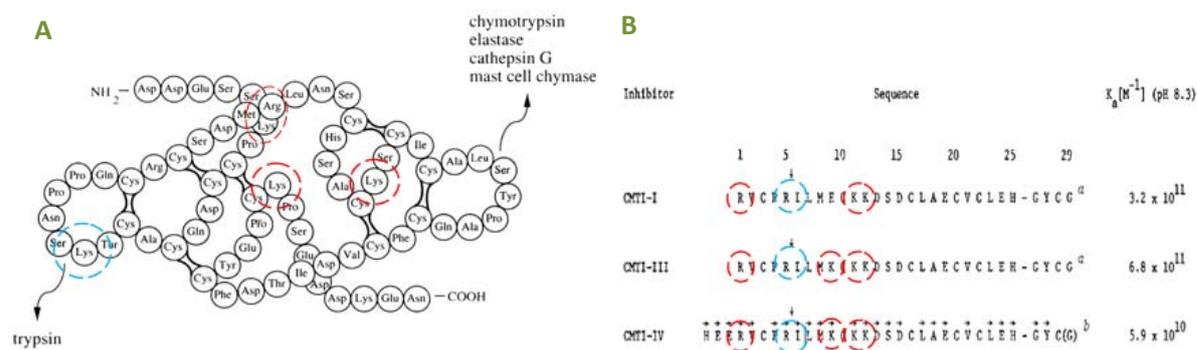


Figura 15: A – estrutura do inibidor Bowman-birk. B – Sequências de aminoácidos referente a 3 isoformas do inibidor CMTI. Os círculos vermelhos indicam possíveis locais de hidrólise triptica, enquanto os círculos azuis indicam a região referente aos domínios inibitórios de tripsina de cada inibidor.

São as proteases que fazem o rompimento da membrana basal e a abertura de caminho na matriz extracelular para formação de novos vasos facilitando a migração e proliferação de células no local para a formação da neovasculatura (Tomanek & Schatteman, 2000). Conhecendo a participação das proteases em todas as etapas de progressão do tumor, incluindo os processos de proliferação, adesão, migração, angiogênese, apoptose e evasão do sistema imune (Laufs *et al.*, 2006; Nyberg *et al.*, 2006), fica claro que os resultados obtidos nesse trabalho, em conjunto com os dados encontrados na literatura, deixam a tripsina como um importante alvo para a ação de medicamentos a fim de impedir a progressão de patologias através do impedimento do crescimento vascular.

Autores como Kennedy, *et al* (2002) & Reinheckel, *et al* (2008) descreveram os inibidores como moléculas que impedem a formação de vasos sanguíneos por impedir a ação de proteases. Nossos dados comprovaram que o impedimento da ação de serino proteases leva a perda do desenvolvimento de vasos sanguíneos em membrana coreoalantóica de *Gallus domesticus*, como pode ser visto no gráfico 3: G1 & G2.

Analisando os resultados dos inibidores de tripsina utilizados nesse trabalho comprovamos o papel importante da tripsina no desenvolvimento angiogênico. A possibilidade de melhorarmos a biodisponibilidade e a atividade dos inibidores para inibir a tripsina se torna então muito promissora.

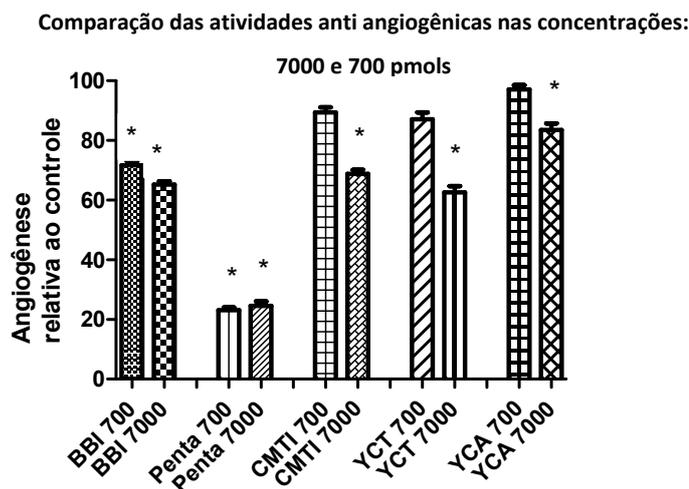


Gráfico 7: Atividade anti-angiogênica dos inibidores nativos (BBI e CMTI), dos domínios inibitórios sintéticos e da pentamidina nas concentrações de 7000 pmols e 700pmols. *atividade inibitória significativamente diferente em relação ao controle positivo ($p \leq 0,05$).

O gráfico 6 facilita a comparação da atividade antiangiogênica de todos os inibidores, mostrando especificamente as aplicações de 7000 e 700 pmols. É possível observar que todos os inibidores, com o domínio para inibição de tripsina ativo, possuíram sempre uma maior ação antiangiogênica, o que comprova a função essencial dessa protease no desenvolvimento vascular. O inibidor CMTI mesmo purificado em condição mais agressiva pela cromatografia de afinidade apresentou atividade semelhante ao BBI purificado em troca iônica, provando que ele suporta razoavelmente melhor esse purificação, porém fica claro que ocorreu a perda de parte da sua capacidade antitripsina quando comparado com os dados da literatura existente. Os inibidores sintéticos demonstraram menos atividade que o inibidor nativo, o domínio antitripsina apresentou maior atividade, enquanto o domínio antiqumotripsina teve uma ação mais modesta, o que deixa claro a atuação principal do domínio antitripsina no crescimento vascular. Observa-se também que a ação dos dois domínios simultaneamente provavelmente acarretaria na ação antiangiogênica observada no inibidor nativo.

Conclusões

8. Conclusões

O inibidor BBI se mostrou um potente inibidor de crescimento vascular alcançando inibições de aproximadamente 35% da angiogênese da membrana coreoalantóica de *Gallus domesticus*, em tratamentos de cinco dias com doses de 7000 pmoles.

Ficou demonstrado que a atividade antiangiogênica do BBI esta relacionada aos seus domínios inibitórios. A atividade da cabeça inibitória de tripsina se mostrou mais ativa que a cabeça inibitória de quimotripsina. A comprovação da atividade antiangiogênica desses análogos sintéticos, exclui a possibilidade que os efeitos observados nas preparações de BBI sejam devido à contaminantes.

O inibidor de *Cucurbita máxima* (CMTI) apresentou capacidade antiangiogênica alta porem menor que o BBI purificado em troca inônica. Ao testar a purificação do BBI em cromatografia de afinidade observou-se perda total de sua atividade antitripsina e antiangiogênica o que comprova uma maior resistência do CMTI a mais esse tipo de purificação e também que o potencial antiangiogênico é diretamente dependente da atividade antitripsina das moléculas.

A pentamidina apresentou a maior atividade antiangiogênica vista nesse trabalho, chegando a inibir até 80% do crescimento vascular. A atividade antiangiogênica da pentamidina foi igual ao efeito máximo obtido com o inibidor Bowman-Birk, quando aplicadas doses 1000 vezes menor que a máxima aplicada do BBI.

9. Perspectivas

- Desenvolver um método de purificação mais efetivo para o inibidor CMTI, a fim de evitar a hidrólise parcial do seu domínios inibitórios e obter sua capacidade total de inibição de tripsina;
- Melhorar a atuação dos domínios sintéticos, através de um aumento na quantidade de material aplicado ou desenvolvendo peptídeos com regiões que possa impedir sua rápida degradação;
- Fazer ensaios proteômicos em 2-D para observar modificações na expressão de proteínas para as aplicações dos diferentes compostos (BBI, CMTI, Domínios inibitórios e Pentamidina) (Experimentos já iniciados, porem ainda sem resultados conclusivos).

Referências Bibliográficas

10. Referências Bibliográficas

Aboul-Enein, H.Y. (1999) Analytical and preparative separation methods of biomacromolecules.572. 8-21.

Auerbach, R. *et al.* (2003) Angiogenesis Assays: A Critical Overview. *Clinical Chemistry* 1. 49-1.

Barbosa, J. A. R. G.; *et al.* (2007) Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in Complex with b-Trypsin at 1.55 Å Resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical Journal* 92. 1638–1650.

Bergers, G. & Benjamin, L. E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nature Publishing Group 3.

Bertrand, J.A.; *et al.* (1996) Inhibition of Trypsin and Thrombin by Amino (4-amidinophenyl) methanephosphonate Diphenyl Ester Derivatives: X-ray Structures and Molecular Models. *Biochemistry* 35. 3147–3155.

Bialas, A. & Kafarski, P. (2009) Proteases as Anti-Cancer Targets - Molecular and biological basis for development of inhibitor-like drugs against cancer. Bentham Science. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9, 728-762.

Bode, W.; *et Al.* (1989) The Refined 2.0 Å X-Ray crystal structure of the complex formed between bovine β -Trypsin and CMTI-I, A trypsin inhibitor from squash seeds (*Cucurbita Maxima*). Elsevier Science Publishers (Biomedical Division) 242, 285-292.

Bode, W. & Huber, R. (1992) *Review: Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases.* *Eur. J. Biochem* 204, 433-451.

Bode, W. & Schwager. (1975) The refined crystal structure of bovine Beta-Trypsin at 1.8 Å Resolution. II. Crystallographic Refinement, Calcium Binding Site, Benzamide Binding Site and active site at pH 7.0. *P. J. Mol. Biol* 98, 693-717.

Carmeliet, P. (2000) Review: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6.

Carmeliet, P. & Jain, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407.

Chen, P.; *et al.* (1992) Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem* 267.

Chen-Yong, L.; Anders, J.; Johnson, M. & Dickson, R. B. (1999) Purification and characterization of a complex containing matriptase and a kunitz-type serine protease inhibitor from human milk. *Biol. Chem* 274, 18237-18242.

Chow T.Y.; *et al.* (2004) The DNA double-stranded break repair protein endo-exonuclease as a therapeutic target for cancer. *Mol Cancer Ther* 3, 911-919.

Clemente, A. & Domoney, C. (2006). Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Curr Protein Pept Sci* 7, 201-216.

Clemente, A.; *et al.* (2010) The cytotoxic effect of Bowman–Birkisoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Molecular Nutrition & Food Research* 54, 396–405.

Coussens, L.M. & Werb, Z. (1996) Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *ChemBiol* 3(11), 895-904.

Cruz, A. C. B. (2008) Purificação, caracterização e análise da atividade bioinseticida de tripsina em sementes de catanduva (*Piptadenia moniliformis*). Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Cudic, M. & Fields, G. B. (2009) Extracellular proteases as targets for drug development. *Current Protein and Peptide Science* 10, 297-307.

Curran, S. & Murray, G.I. (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 189(3), 300-308.

Daly, N. L.; *et al.* (2013) Structural insights into the role of the cyclic backbone in a squash trypsin inhibitor. *Journal Of Biological Chemistry* 288.

Dia, V. P. & Mejia, E. G. (2010) Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression. *Cancer Letters* 295, 44–53.

Drewes, C. C.; *et al.* (2012) Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon* 60, 333–340.

Dia, V.P; *et al.* (2009) Isolation, purification and characterisation of Lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry* 114, 108-115.

Du X.; Beloussow, K.; Shen, W. C. (2001). Bowman-Birk protease inhibitor and its palmitic acid conjugate prevent 7,12-Dimethylbenz[A]Anthracene-Induced transformation in cultured mouse mammary glands. *Elsevier Cancer Letters* 164.135±14.

Duffy, M.J.; MCGowan, P.M.; Gallagher, W.M. (2008) Cancer invasion and metastasis: Changing Views. *J Pathol* 214(3), 283-293.

Etoh, T. *et al.*, (2001) Angiopoietin-2 Is Related to Tumor Angiogenesis in Gastric Carcinoma: Possible *in Vivo* Regulation via Induction of Proteases. *Cancer Res* 61, 2145-2153.

Fernandez, J.H.; *et al.* (2007) Proteinase inhibition using small Bowman-Birk-type structures. *Genetics and Molecular Research* 6, 846-858.

Fernandez-Fernandez M.R.; Veprintsev D.B.; Fersht A.R. (2005) Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(13), 4735±40.

Frank, L. & Meyskens, J.R. (2006) Development of Bowman-Birk inhibitor for chemoprevention of oral head and neck cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 952, 116–123.

Gariani, T.; McBride, J. D. & Leatherbarrow, R. J. (1999) The role of the P2' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin. *Studies on P2'*

variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. *Biochim Biophys Acta* 1431, 232-237.

Griffioen, A. W & Molema, G. (2000) Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 52.

Hernández-Ledezma, B.; *et al.* (2009) Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US commercial soy foods. *Food Chemistry* 115, 574-580.

Hildebrandt, E.; *et al.* (1998) Identification and characterization of an endo/exonuclease in *pneumocystis carinii* that is inhibited by DicationicDiarylfurans with efficacy against *Pneumocystis pneumonia*. *J EukaryotMicrobiol* 45, 112-121.

Hoeben, A.; *et al.* (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews. Pharmacol* 56, 549–580.

IARC Publications. World Cancer Report 2008. Boyle, P.; Levin, B. WHO Library. WHO Library. Geneva, Switzerland. (2010).

Jasèkiewicz, A.; *et al.* (1998) Modifications outside the proteinase binding loop in Cucurbita maxima trypsin inhibitor III (CMTI-III) analogues change the binding energy with bovine L-trypsin. *Letters* 436, 174-178.

Juca, M.; *et al.* (2008) Metaloproteinases 1 e 7 e câncer colorretal. *Rev bras. colo-proctol* 28.

Kashiwagi, K.; *et al.* (2011) Bowman-Birk protease inhibitor from soybeans enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human mesothelioma cells. *Experimental And Therapeutic Medicine* 2, 719-724.

Kennedy, A. R. (1998) The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr* 68, 1406S–12S.

Kennedy, A.; Billings, P.; Wan, X. & Newberne, P. (2002) Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 43, 174-186.

Kobayashi, J.; *et al.* (2010) Bisbenzamidine derivative, pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation. *Molecular Cancer* 9:34.

Koblinski, J. E.; Ahram, M. & Sloane, B. F. (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 291, 113-135.

Krishnamoorthil, R.; Gong, Y. & Richardson, M. (1990) A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds. *Elsevier science (Biomeical Division)* 273, 163-167.

Laskowski, Jr. M. & Qasim, M. A. (2000) What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *BiochimicaetBiophysicaActa* 1477, 324-337.

Laufs, S.; Schumacher, J. & Allgayer, H. (2006). Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* 5, 1760-1771.

Laure, H.J.; *et al.* (2006) Low molecular weight squash trypsin inhibitors from *Sechiumedule* seeds. *Phytochemistry* 67, 362–370.

Li, J.; *et al.* (2000) PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nature Medicine* 6.

Longstaff, C.; Campbell, A.F. & Fersht, A.R. (1990) Recombinant Chymotrypsin Inhibitor-2- Expression, kinetic-analysis of inhibition with alpha-chymotrypsin and wild-type and mutant SubtilisinBpn', and protein engineering to investigate inhibitory specificity and mechanism. *Biochemistry* 29, 7339-7347.

Lopes, J. L. S. (2006) Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de semente de *Acácia Plumosa Lowe*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Carlos.

Lucena, S. V. (2005) Purificação, caracterização e avaliação da atividade antiproliferativa de um inibidor de quimotripsina tipo kunitz de semente de *Erythrina velutina*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Machado, A.; *et al.* (2004) Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios Básicos e Aplicações. Quím. Nova 27.

Manas, K.P.; *et al.* (2002) Pentamidine is and Inhibitor of PRL Phosphatases with Anticancer 1 supported in part by NIH Grants R01CA79891 and R01MG58893 (to T. Y.) and CA90914 (to E. C. B.). Mol Cancer Ther December 1,1255-1264.

Marchetto, R. (2013) Peptídeos sintéticos como aplicação na área de saúde: Perspectivas de inovação. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal Paulista.

Markowitz, J.; *et al.* (2004) Identification and characterization of small molecule inhibitors of the calcium-dependent S100B-p53 tumor suppressor interaction. Journal of medicinal chemistry 47, 5085–93.

Massilia, G. R.; *et al.* (2001) Contryphan-Vn: A Novel Peptide from the Venom of the Mediterranean Snail *Conus ventricosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288.

McBride J.D.; Freeman N.; Domingo G.J. & Leatherbarrow R.J. (1996) Selection of chymotrypsin inhibitors from a conformationally-constrained combinatorial peptide library. *J. Mol. Biol.* 259, 819-827.

McBride J.D.; *et al.* (2002) Peptide Mimics of the Bowman-Birk Inhibitor Reactive Site Loop. *Biopolymers* 66, 79-92.

Mendonça, R.J. & Coutinho-Netto, J. (2009) Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol* 84, 257-62.

Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J Am Chem Soc* 85, 2149-2154

Messina, M. & Barnes, S. (1991) The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst* 83, 541–6.

Miyata, S.; *et al.* (1999) Expression of trypsin in human cancer cell lines and cancer tissues and its tight binding to soluble form of Alzheimer amyloid precursor protein in culture. *J Biochem.* 125, 1067-76.

Mitchell, R.N.; Kumar, V.; Abbas, K.A. & Fausto, N. (2006) Robbins & Cotran, Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro. 7ª ed. Elsevier. p.153-185.

Moreira, L.F. (2007) Efeito do inibidor de seriono-protease, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embriônico de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

Mylne, S.S.; *et al.* (2012) Cyclic Peptides Arising by Evolutionary Parallelism via Asparaginyl Endopeptidase Mediated Biosynthesis. *The Plant Cell* 24, 2765–2778.

Nyberg, P.; Ylipalosaari, M.; Sorsa, T. & Salo, T. (2006). Trypsins And Their Role In Carcinoma Growth. *Exp Cell Res* 312, 1219-1228.

Oliva, M. L. V. & Sampaio, M. U. (2009) Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81, 615-621.

Pandya, N. M.; *et al.* (2006) Review: Angiogenesis—A new target for future therapy. Elsevier. *Vascular Pharmacology* 44, 265–274.

Parker, C.L.; *et al.* (1993) The inhibitory effects of pentamidine on biochemical events in human liver cells. *Toxic. in Vitro* 7, 177-184.

Paula, C.D.R.; Sampaio, J.H.D.; Cardoso, D.R. & Sampaio, R.N.R. (2003) Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/ dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36, 365-371

Pereira, R. A. (2005) Inibidores proteicos e seu potencial uso no controle de insetos-pragas de importância para a cultura do café e do feijão. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília.

Perilo, C. S.; *et al.* (2010) Structural binding evidence of the trypanocidal drugs Berenil® and Pentacarinate® active principles to a serine protease model. *International Journal of Biological Macromolecules* 46, 502–511.

Peto, J. (2001) Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411, 390-395.

Prakash, S.; *et al.*, (2011) Production and partial purification of protease by selected bacterial strains using raw milk as substrate. *Malaysian Journal of Microbiology* 7, 192-200.

Puckowska,A.; Midura-Nowaczek, K. & Bruzgo, I. (2008) Effects of netropsin and pentamidine amino analogues on the amidolytic activity of plasmin, trypsin and urokinase. *Acta Poloniae Pharmaceutica & Drug Research* 65, 213-215.

Ramjaun, A.R. & Hodivala-Dilke, K. (2009) The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 521–530.

Rao, M. B.; *et al.* (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 597–635.

Reinheckel, T.; Gocheva, V.; Peters, C. & Joyce, J.A. (2008) Roles of Cysteine Proteases in Tumor Progression: Analysis of Cysteine Cathepsin Knockout Mice in Cancer Models. *The Cancer Degradome Proteases and Cancer Biology*.Springer New York. p. 281-304.

Ribatti, D.; *et al.* (2000) The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model for *in vivo* Research on Anti-Angiogenesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 1, 73-82.

Sands, M.; Kron, M. A. & Brown, R. B. (1985) Pentamidine: A Review. *Reviews of Infectious Diseases* 7.

Silva, F. V. (2014) Avaliação da atividade antiangiogênica do peptídeo sintético análogo a lunasina e do inibidor bowman-birk em membrana coriolantóica de *Gallus Domesticus*. Dissertação De Mestrado. Núcleo De Pesquisa Em Ciências Biológicas – NUPEB. Unversidade Federal De Ouro Preto.

Song, G.; *et al.* (2008) HV-BBI - A novel amphibian skin Bowman–Birk-like trypsin inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372, 191–196.

Smith, J.; *et al.* (2010) The effect of pentamidine on melanoma. *Anticancer Drugs* 21(2), 181–185.

Takeuchi, T.; Shuman, M.A. & Craik, C.S. (1999) Reverse Biochemistry: Use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *ProcNatlAcadSci USA* 96, 11054-11061.

Talhout, R.; *et al.* (2003) Understanding Binding Affinity: A combined isothermal titration calorimetry/molecular dynamics study of the binding of a series of hydrophobically modified benzamidinium chloride inhibitors to trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10570–10579.

Tan-Wilson, A. L.; *et al.* (1985) Differential expression of Kunitz and Bowman-Birk soybean proteinase inhibitors in plant and callus tissue. *Plant Physiol* 78, 310-314.

Thaimattam, R.; *et al.* (2002) Atomic resolution structure of squash trypsin inhibitor: Unexpected metal coordination. *ActaCryst.* D58, 1448-1461.

Tomanek, R. J. & Schatteman, G. C. (2000) Angiogenesis: New Insights and Therapeutic Potential. *The AnatomicalRecord (New Anat.)* 261, 126–135.

Tremacoldi, C. R. (2009) Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Embrapa Amazônia Oriental. 44p.

Van-Hinsbergh, V.W.M; Engelse, M.A & Quax, P.H.A. (2006) Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscleroses, Thrombosis and Vascular Biology*: American Heart Association, Amsterdam, 26, Feb. Disponível em <<http://atvb.ahajournals.org/content/26/4/716.full>> . Acesso em 8 de Mai. 2015.

Vousden K.H. & Lane D.P. (2007) P53 in Health and Disease. Nature reviews. Molecular cell biology 8(4), 275–83.

Wang, J. & Shen, W-C. (2000) Gastric retention and stability of lipidized Bowman–Birk protease inhibitor in mice. International Journal of Pharmaceutics 204, 111–116.

Weinberg, A.; *et al.* (1990) Aerossol de pentamidina no tratamento da pneumonia por *Pneumocystis carinii* em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 32.

Wiecaorek, M.; *et al.* (1985) The squash family of serine proteinase inhibitors amino acid sequenceas and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini, and cucumber seeds. Biochemical And Biophysical Research Communications126, 646-652.

Woessner, J.F. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J. 5(8), 2145- 2154.

Yamashita, K.; *et al.* (2003) A Tumor-suppressive role for trypsin in human cancer progression. Cancer Research 63, 6575–6578.