

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**EFEITOS DO INIBIDOR DE PROTEASES *BLACK-EYED PEA TRYPSIN*
CHYMOTRYPSIN INHIBITOR (BTCI) NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS *MDA-MB-231* DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO**

Giselle Xavier Reis Brumana

Brasília 06 de Março de 2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**EFEITOS DO INIBIDOR DE PROTEASES *BLACK-EYED PEA TRYPSIN*
CHYMOTRYPSIN INHIBITOR (BTCl) NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS *MDA-MB-231* DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO**

Giselle Xavier Reis Brumana

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Maria de Freitas

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Zulmira Lacava

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

Brasília

2015

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar forças e condições de levar este mestrado adiante a cada dia, assim como pelos desafios encontrados ao longo da jornada, porquê conduziram os meus passos para o caminho rumo ao amadurecimento e preparo para o desconhecido.

Imagino que este seja o momento ideal para atribuir os devidos méritos e créditos à minha mãe, que sempre e incondicionalmente apoiou minha vida acadêmica sem deixar de lado o amor.

Abnegando-se em muitos pontos é que me impulsionou.

Sou grata aos meus mentores - Natan Monsores, Wagner Fontes e Sonia Freitas - por terem me acolhido e aberto as portas para mim, assim pude avistar novos horizontes. Em nome destes, homenageio também aqueles que foram meus professores desde as séries iniciais, pois sem sua base e os infindos devaneios filosóficos eu não seria a mesma.

Quero através deste reconhecimento compensar os estagiários - Ítala Negrini, Bárbara Yasmin, YoHwa Farias, Kegna Tayrane, Juliana Simas, Victor Fernandes, Pedro Henrique, Luisa Meneghetti e principalmente Nycolle Xaindê - por tantas horas de trabalho e dedicação, que eles saibam que não foram esquecidos, e sim, foram relevantes!

Quero aqui retribuir o carinho que recebi de meus colegas/amigos de trabalho, terei em minhas lembranças muitos sorrisos e recordações do companheirismo.

Sou feliz por ter o privilégio de escoar minhas tensões, frustrações e ansiedades através dos momentos de interação e alegria com Mindy, Preta, Jo e Catish.

Agradeço aos colaboradores e à banca pelo apoio. Em especial à Azadeh por tantas horas empreendidas em meu favor e por compartilhar comigo a sabedoria persa em seu escritório. Assim como ao Dr. Luciano por suas minuciosas instruções e cuidadoso acompanhamento.

Minha gratidão maior é ao meu esposo, por sua importância no presente. Ele foi quem acompanhou de perto essa turbulenta caminhada, quem acreditou em mim quando eu me senti incapaz, quem me disse para continuar quando meu desejo era desistir, quem cuidou de tudo para eu poder estudar. Foi ele quem me tirou da loucura quando afundei e me levou à razão quando ela faltou. Meu esteio, meu provedor, meu humorista, meu conselheiro, meu amigo, meu anjo e meu amor!

RESUMO

O adenocarcinoma mamário, assim como outras manifestações do câncer, é o fenótipo patológico desencadeado por processos multifatoriais e desenvolvimento multiprocessual, decorrente de alterações do controle de proliferação e crescimento celular. Nesse estudo os efeitos do inibidor de proteases *black-eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor* (BTCI) foram avaliados na viabilidade e proliferação de células de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231), *in vitro*, visando caracterizar o BTCI como potencial agente anticarcinogênico nesse tipo de câncer, ensaios de viabilidade celular, avaliações de morte celular e ciclo celular por citometria de fluxo, bem como o estudo da geração de espécies moleculares reativas de oxigênio (EROS). A partir da determinação da Concentração Inibitória (IC₅₀) de BTCI (267,4 µM em 24 horas) a interferência deste inibidor sobre o ciclo celular da linhagem em questão foi avaliada e um aumento do número de células na fase G2 foi observado, assim como a presença de DNA fragmentado. A via de morte das células de adenocarcinoma mamário tratadas com BTCI foi estudada e constatou-se que a média das células que sofreu morte por apoptose foi de 89,4%, valor significativo, sendo $p < 0,001$. Ademais, o processo de oxidação celular via Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) foi intensificado em 24h de incubação. Os resultados obtidos indicam que o BTCI causa efeitos citostático e citotóxico nas células analisadas, sendo a principal via de morte celular a apoptose, processo que pode estar associado à oxidação celular através de radicais livres de oxigênio.

PALAVRAS-CHAVE:

Adenocarcinoma Mamário; Câncer de Mama; Inibidores de Serinoproteases; MDA-MB-231; Apoptose.

ABSTRACT

The mammary adenocarcinoma as well as other manifestations of cancer, is the pathological phenotype triggered by multifactorial processes and multiprocessual development, due to proliferation and cell growth control changes. In this study the effects of the black-eyed pea trypsin chymotrypsin protease inhibitor (BTCI) were evaluated in breast adenocarcinoma cell (MDA-MB-231) proliferation and feasibility in vitro, in order to characterize the BTCI as a potential anticarcinogenic agent for this type of cancer cell. Thus viability assays, assessments of cell cycle and cell death by flow cytometry, as well as study of the generation of reactive oxygen molecular species (ROS) were performed. Upon determining the inhibitory concentration (IC_{50}) of BTCI (267.4 μ M in 24 hours) the interference of the inhibitor on cell cycle was evaluated and an increased number of cells in the G2 phase was observed, as well as presence of fragmented DNA. The death pathway of mammary adenocarcinoma cells treated with BTCI was studied and it was found that the average of the cells that entered death process by apoptosis was 89.4%, significant value $p < 0.001$. Furthermore, cell oxidation process via Oxygen Reactive Species (ROS) was intensified after 24 hours of incubation. The results indicate that BTCI has cytostatic and cytotoxic effects on the analyzed cells. The main pathway of cell death was apoptosis, a process that may be associated with cellular oxidation by oxygen free radicals.

KEYWORDS:

Mammary Adenocarcinoma; Breast Cancer; Inhibitor of Serine Proteases; MDA-MB-231; Apoptose.

LISTA DE SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato

Bak – Proteína de Morte Associada a Bcl-2

Bax – Proteína X Associada a Bcl-2

BBI – Inibidor do tipo Bowman-Birk extraído de grãos de soja

BTCI – Black-eyed pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor; Inibidor de Tripsina e Quimotripsina extraído de *Vigna unguiculata*

CO₂ – Gás Carbônico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FLICA – Inibidores de Caspases marcados com Fluorescência

FITC – Fluoresceína Isothiocianato

g – Grama

g – Força G

h – Hora

HCl – Ácido Clorídrico

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

ISp – Inibidores de Serinoproteases

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano

kDa – Quilo Dalton

L – Litro

M – Molar

MagDex – Maghemita recoberta por Dextrana

MALDI-TOF – Ionização e Desorção à Laser assistida por Matriz e análise por Tempo de Voo

MAP – Proteína Quinase Ativada por Mitógenos

μL – Microlitro

mL – Mililitro

μM – Micromolar

mM – Milimolar

MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobrometo

NaCl – Cloreto de Sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
nm – Nanômetro
OMS – Organização Mundial de Saúde
°C – Graus Celsius
PBS – Tampão de Fosfato de Sódio
PCP – Polaridade Celular Plantar
pH – Potencial de Hidrogênio
PI – Inibidores de Planta
PI – Iodeto de Propídeo
PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
EROS – Espécie Reativa de Oxigênio
RPM – Rotações por Minuto
SFB – Soro Fetal Bovino
TCA – Ácido Tricloracético
TCC – Tese de Conclusão de Curso
TGF- α – Fator de Crescimento Transformante alfa
TNF – Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** "Estadiamento do Câncer: Estádio 0 = carcinoma *in situ*, iniciado com uma displasia; Estádio I = tumor local (até 2 cm), sem comprometimento linfático; Estádio II = tumor em mais de um tecido (entre 2 e 5 cm); Estádio III = tumor em mais de um tecido (mais de 5 cm), com comprometimento linfático; Estádio IV = metástase, acometimento de regiões secundárias. Imagem obtida em: <<http://www.sbmastologia.com.br/index/index.php/estagios-docancer>>." **03**
- FIGURA 2.** "Total de Mortes por Câncer de Mama em Homens e Mulheres na faixa etária de 20 a 99+, no período de 1979 a 2012 nas cinco regiões do Brasil. Imagem modificada a partir de: INCA, 2014 <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>>." **04**
- FIGURA 3.** "Representação da correlação entre o número estimado de casos (×1000) do câncer de mama e o índice de desenvolvimento humano (IDH) em todas as faixas etárias. Sabendo-se que o IDH é classificado entre zero e 1, consideram-se: países com o desenvolvimento muito alto aqueles cuja nota encontra-se ente 1 e 0,808; países com desenvolvimento alto são aqueles cuja nota encontra-se entre 0,790 e 0,700; países com desenvolvimento médio são aqueles cuja nota encontra-se entre 0,698 e 0,556; países com desenvolvimento baixo são aqueles cuja nota encontra-se entre 0,540 e zero; Imagem modificada a partir de: OMS¹ - Cancer Fact Sheet <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>; legenda conforme <<http://hdr.undp.org/sites/default/files/hdr14-summaryen.pdf>>." **05**
- FIGURA 4.** "Ilustração da movimentação de uma célula MDA-MB-231 através de seus pseudópodes (projetados pela porção dianteira da célula) e espículas laterais ou protrusões líticas (projetadas do corpo da célula). Imagem adaptada de WOLF & FRIEDL, 2009." **08**
- FIGURA 5.** "Modelo computacional do BTCl. Em destaque encontram-se os sítios ativos da molécula. Imagem de Freitas *et al.*, 1999." **11**
- FIGURA 6.** "Etapas da célula em apoptose. Na iniciações ocorre a redução do volume celular; A etapa da deliberação é caracterizada morfológicamente pelos prolongamentos da membrana celular (*blebbing*); Por ocasião da execução são formados os corpos apoptóticos; Na etapa de depuração ocorre a fagocitose dos corpos apoptóticos. Imagem modificada a partir de: <<http://www.buzzle.com/images/diagrams/apoptosis-morphological-changes.jpg>>." **17**
- FIGURA 7.** "Distribuição por idade dos sobreviventes de câncer de mama invasivo, no Estados Unidos, em 2014. Apenas do sexo feminino. Imagem modificada a partir de: DESANTIS *et al.*, 2014." **20**
- FIGURA 8.** "Fluxograma do desenho experimental." **23**
- FIGURA 9.** "Esquema didático para compreensão do funcionamento da marcação com Anexina-V e do Iodeto de Propídeo para avaliação do mecanismo de morte celular. A translocação da fosfatidilserina da interface citoplasmática para a superfície extracelular

favorece a marcação extracelular com a anexina, em células em estágios iniciais da apoptose. Ao passo que, células em apoptose tardia sofrem perda da integridade da membrana citoplasmática e isto possibilita a permeabilização do PI, cuja função como marcador é intercalar-se no DNA celular." 29

FIGURA 10. "Cromatograma obtido a partir do extrato bruto de *Vigna unguiculata*. As amostras eluídas foram monitoradas por leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Destacado em vermelho está a fração utilizada para a recromatografia." 31

FIGURA 11. "Recromatograma obtido a partir das amostras pré-fracionadas de BTCI (figura 10). As amostras eluídas foram monitoradas por leitura em espectrofotômetro a 280 nm." 31

FIGURA 12. "Sistema de ultrafiltração Amicon® da Millipore. No lado B da figura observam-se os componentes necessários para o funcionamento do sistema: ¹descarte; ²sistema Amicon; ³cânulas; ⁴manômetro; ⁵cilindro com gás nitrogênio. Imagens adaptadas de: <<https://www.merckmillipore.com/BR/pt/life-science-research/protein-sample-preparation/protein-concentration/large-volumes-samples/amicon-stirred-cells/tYyb.qB.CPEAAAFBxwtlvyxv.nav>> e <<http://pt.medwow.com/med/water-purification-system/millipore/amicon-8050/57641.model-spec>>." 32

FIGURA 13. "Espectro de massa do BTCI obtido por recromatografia de troca iônica. A massa molecular e pureza do BTCI são mostradas, com um único pico de ~9,1 kDa (SILVA *et al.*, 2005; ESTEVES *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2014; ÁLVARES *et al.*, 2014) e o menor pico equivalendo a sua dupla carga ($[M+2H]^+$).". 33

FIGURA 14. "Curva de viabilidade celular ajustada das células MDA-MB-231, na presença do BTCI. O BTCI, na concentração de 267,4 µM por 24h." 34

FIGURA 15. "Gráfico de barras da viabilidade celular das células MDA-MB-231. O BTCI na concentração de 267,4 µM por 24h, sendo $p < 0,005$." 34

FIGURA 16. "Histogramas de ciclo celular, onde as médias calculadas foram: A) 50,7% das células encontravam-se em G1; 19,2% em fase S; e 11,8% em G2; B) 18,6% das células encontravam-se em G1; 7,8% em fase S; e 7,8% em G2." 36

FIGURA 17. "A análise estatística do PI Ciclo Celular demonstrou que o BTCI aumentou a fração G2, caracterizando um efeito citostático sobre as células da linhagem MDA-MB-231 em comparação com o grupo não tratado (NS)." 37

FIGURA 18. "Análise da via de morte celular. A) Células MDA-MB-231 viáveis, não tratadas com BTCI; B) Células MDA-MB-231 submetidas a inativação, marcadas com PI, controle do kit; C) Células MDA-MB-231 submetidas a inativação, marcadas apenas com Anexina-V, controle do kit; D) Células controle de MDA-MB-231, não incubadas com BTCI; E) Células de MDA-MB-231 tratadas com 267,4 µM de BTCI por 24h, morte por apoptose em 94,9% na unicata (como apresentado no *Dot Plot* ilustrativo) e média de 89,39% nas triplicatas." 38

FIGURA 19. "Análise da via de morte celular das células de MDA-MB-231 tratadas com 267,4 µM de BTCI por 24 h, e marcadas com Anexina-V." **39**

FIGURA 20. "O efeito de 267,4 µM de BTCI na produção intracelular de EROS em células MDA-MB-231 em diferentes tempos. A) Intensidade de espécies reativas de oxigênio em células tratadas por BTCI durante 30, 60 e 90 minutos, além de 24 horas; B) Histograma comparativo da produção de EROS em células não estimuladas e tratadas por 24 horas com BTCI; C) Gráfico de barras com a média de células tratadas com BTCI em diferentes tempos - não estimulada, 30, 60, 90 minutos e 24 horas - e a respectiva produção de espécies reativas de oxigênio. *Resultado Aleatório e **Resultado Significativo $p < 0,005$." **40**

FIGURA 21. "Ilustração do mecanismo de intervenção, dependente da fase do ciclo celular, de diversas categorias de agentes quimioterápicos antineoplásicos. Imagem adaptada apartir de ALMEIDA *et al.*, 2005." **44**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. "Comparação dos tipos de morte celular." **16**

Tabela 2. "Composição do meio de cultura L-15 Leibovitz, fonte: <<http://www.cultilab.com.br/paginas/inftec1.6.html>>." **26**

Tabela 3. "Estudo comparativo do ciclo celular entre as populações tratadas - com 267,4µM de BTCI por 24h - e não tratadas. Análise feita com as células viáveis." **35**

Tabela 4. "Relação entre o tipo de interação com o ciclo celular e as subclasses de produtos naturais. Classificação feita por ALMEIDA e colaboradores (2005)." **44**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO PROPOSTO	1
1.2. CARCINOGENESE & CÂNCER MAMÁRIO	2
1.3. LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO - MDA-MB-231	7
1.4. PAPEL DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER	8
1.5. INIBIDORES BBI E O CÂNCER	9
1.6. INIBIDOR DE TRIPSINA/QUIMOTRIPSINA DE <i>VIGNA UNGUICULATA</i> - BTCI	11
1.7. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO - EROS	14
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BTCI	23
4.1.1. EXTRATO BRUTO	23
4.1.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	24
4.1.3. EPECTROMETRIA E MASSA -MALDI	25
4.2. MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT	25
4.3. ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO	27
4.3.1. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR	27
4.3.2. AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE MORTE CELULAR	28
4.3.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO - PRODUÇÃO DE EROS	29
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS	30
5.1. PURIFICAÇÃO DO BTCI	30
5.1.1. PADRONIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DO BTCI	30
5.1.2. GRAU DE PUREZA DO BTCI AVALIADO POR MALDI-TOF	32
5.2. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - MTT	32
5.2.1. PADRONIZAÇÃO DO TRATAMENTO COM BTCI	33

5.3. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MECANISMOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
5.3.1. ANÁLISE DE CICLO CELULAR	35
5.3.2. VIA DE MORTE CELULAR	37
5.3.3. ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)	39
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES	46
8. PERSPECTIVAS	47
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO PROPOSTO

O câncer é uma doença ocasionada por células mutantes, nas quais os processos de diferenciação e crescimento celular encontram-se alterados. O fenótipo associado a esses processos é o descontrole na proliferação celular devido, parcialmente, à perda da inibição por contato célula a célula.

As diversas mutações acumuladas na célula levam ao mau funcionamento celular, com a possibilidade de: imortalização celular; neoangiogênese; auto estimulação da proliferação, por meio da expressão de fatores de crescimento autólogos (HANAHAN, 2000); aumento na expressão de receptores para hormônios e mensageiros que dão início à multiplicação celular, dentre outros.

Esses e outros fatores trazem mudanças no ciclo celular que ocorrem em virtude de alterações genéticas relacionadas aos genes supressores de tumor, oncogenes ou proto-oncogenes (WEINBERG, 2007).

Dentre os vários tipos de câncer conhecidos, o mais frequente na população feminina é a neoplasia maligna de tecido mamário. Dentre estes, os adenocarcinomas invasivos apresentam maior taxa de mortalidade, podendo originar-se de glândulas ductais ou lobulares (EISENBERG & KOIFMAN, 2000).

Atualmente as técnicas aplicadas para o tratamento deste tipo de câncer são limitadas, portanto o desenvolvimento de agentes terapêuticos adjuvantes com efeitos colaterais menos severos e que não reduzam tanto a qualidade de vida dos pacientes é imperativo.

Os inibidores de serinoproteases, com proposta para prevenção e tratamento de diversos tipos de cânceres, vêm ganhando espaço no meio científico (GORCZYCA *et al.*, 1992; LÓPEZ-OTÍN & MATRISIAN, 2007), como enfatizado por FURUKAWA *et al.* (2013):

"Inibidores de serinoproteases tem efeitos adversos mínimos e apresentam potencial para tornarem-se novas opções terapêuticas para pacientes de câncer."

Dentre os diversos inibidores de serinoproteases, é destacado nesta dissertação o inibidor de tripsina e quimotripsina denominado BPCI (Black-eyed pea

Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor), extraído de *Vigna unguiculata* e pertencente à família dos inibidores Bowman-Birk (BBI). Inibidores dessa família têm sido amplamente estudados e caracterizados bioquimicamente, visando aplicações biotecnológicas (MCBRIDE & LEATHERBARROW, 2001; QI *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2014).

O BTCI vem sendo estudado há mais de 40 anos e já foi caracterizado em vários aspectos físico-químicos, estruturais e funcionais. Adiante são relatados tópicos alusivos ao BTCI associado ao câncer de mama, especificamente, da linhagem de células MDA-MB-231. Ambos, objetos de estudo do presente trabalho.

1.2. CARCINOGENESE & CÂNCER MAMÁRIO

A habilidade de diversos tipos celulares na morfogênese tecidual é fundamental para a manutenção do indivíduo adulto, bem como para o reparo de danos causados por fatores diversos (Clemente, 2014). Porém, o desequilíbrio e descontrole dessas células nesse processo podem promover alterações fisiológicas, de origem monoclonal ou policlonal, capazes de modificar a diferenciação e proliferação celular (WEINBERG, 2007; FURLAN *et al.*, 2003).

A incidência de qualquer tipo de neoplasia maligna é decorrente do desencadeamento multifatorial que pode ocorrer nos mais variados tecidos do organismo humano (HANAHAN, 2000). Por ter diversas causas, a carcinogênese varia de acordo com o órgão ou tecido em questão. Porém, em todos os casos estudados, ocorre a formação de tecido com aspecto desorganizado (SCULLY *et al.*, 2000).

Portanto, esta patologia decorre de alterações do controle de proliferação e crescimento celular, ocasionadas pela ação de fatores etiológicos que geram mutações genéticas e, conseqüentemente, alteração de fenótipo (OMS², 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS⁴, 2014) constatou, em 2014, que 60% dos novos casos anuais de câncer são oriundos de países em desenvolvimento e com um grande contingente populacional. E da totalidade de casos detectados a cada ano, 30% poderiam ser evitados com a prevenção primária (OMS⁴, 2014).

Como o desenvolvimento do câncer ocorre de maneira progressiva (HANAHAN, 2000), há um amplo espectro de tecidos que aparecem em estágios intermediários (figura 1), entre aqueles que são considerados normais e os altamente malignos. Quanto mais distintos dos normais, maior será a sua agressividade e potencial invasor (WEINBERG, 2007).

Por este motivo, os diversos estágios da progressão tumoral são denominados de neoplasias, caracterizadas pela fase pré-rompimento da membrana basal. Os estágios de iniciação tumoral são classificados como neoplasias benignas ou câncer *in situ*. As etapas mais avançadas do desenvolvimento do tumor, caracterizadas pelo rompimento da membrana basal e invasão do tecido adjacente, são denominadas neoplasias malignas ou cânceres invasivos.

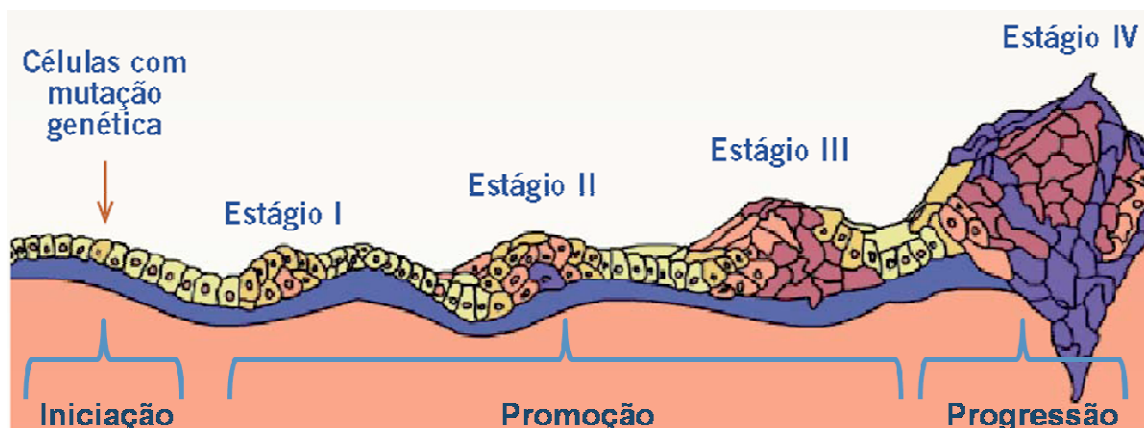


Figura 1: Estadiamento do Câncer: Estádio 0 = carcinoma *in situ*, iniciado com uma displasia; Estádio I = tumor local (até 2 cm), sem comprometimento linfático; Estádio II = tumor em mais de um tecido (entre 2 e 5 cm); Estádio III = tumor em mais de um tecido (mais de 5 cm), com comprometimento linfático; Estádio IV = metástase, acometimento de regiões secundárias. Imagem obtida em: <<http://www.sbmastologia.com.br/index/index.php/estagios-do-cancer>>.

Dentre os numerosos tipos de cânceres estudados e caracterizados destacam-se aqueles de alta invasibilidade, os metastáticos. Neoplasias com tais características vinculam-se a prognósticos negativos devido ao estabelecimento e desenvolvimento de focos tumorais secundários em outra(s) região(ões) do corpo, distinta(s) daquela(s) que os originou (FEREIDUNIAN, 2014).

A incidência de câncer e a agressividade dele em humanos é dependente de diversos fatores, tais como predisposições/heranças genéticas, fatores de risco ambiental, estilo de vida e exposição ocupacional, dentre outros (WEINBERG, 2007; OMS¹, 2006). Mundialmente, o câncer é uma das principais causas de morte, chegando a 8,2 milhões de mortos em 2012, das quais 521 mil vítimas foram contabilizadas com câncer de mama.

A capacidade de células especializadas reverterem-se a estágios de células indiferenciadas (desdiferenciação) é ativada em células neoplásicas. Esse processo possibilita a formação tumoral em qualquer tipo de tecido, mesmo os especializados,

dentre os quais merecem destaque as células epiteliais. Tais tipos celulares geram os tipos de câncer mais frequentes (80%) da humanidade.

As células secretoras do epitélio podem originar adenocarcinomas, sendo que tanto estes quanto os carcinomas podem ser provenientes de células de qualquer uma das três camadas do embrião primitivo (WEINBERG, 2007). Sendo que o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente e o mais comum entre as mulheres (ROCK, 2013; INCA, 2010; OMS³, 2009). No Brasil a estimativa (ver figura 2) desse tipo de câncer para 2014 é de 57.120 novos casos (INCA).

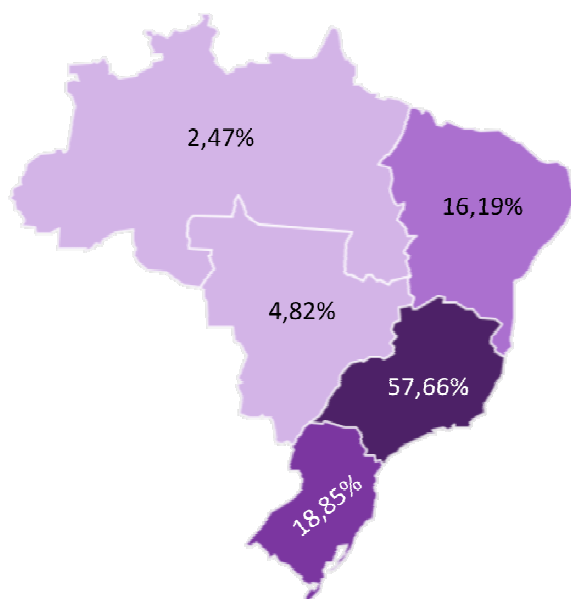


Figura 2:™Total de Mortes por Câncer de Mama em Homens e Mulheres na faixa etária de 20 a 99+, no período de 1979 a 2012 nas cinco regiões do Brasil. Imagem modificada a partir de: INCA, 2014 <<https://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade Web/>>.

O câncer de mama era considerado como neoplasia de países desenvolvidos, entretanto, atualmente, a incidência dessa doença nos países em desenvolvimento vem aumentando, provavelmente pelo aumento da tecnologia médico-hospitalar que possibilita a detecção de patologias que anteriormente não eram constatadas nem registradas. Contudo, ainda há uma correlação entre o IDH (índice de desenvolvimento humano) e a incidência deste tipo de câncer, pois, segundo o INCA (2013):

"O câncer de mama está relacionado ao processo de urbanização da sociedade, evidenciando-se um maior risco de adoecimento entre mulheres com elevado status socioeconômico. Ele é mais comum nas mulheres que vivem nas grandes cidades do que naquelas que vivem em áreas rurais."

Já foi verificado que fatores associados ao estilo de vida, tais como dieta e atividade física, podem ser importantes moduladores do risco de desenvolvimento do

câncer de mama (WU *et al.*, 1996). Nesse contexto, levando em consideração que os países do ocidente são aqueles que apresentam as maiores taxas de câncer de mama em mulheres (HSIEH, 2010), presume-se que fatores nutricionais particulares dessas populações podem ter papel importante nesta patologia (STOLL, 1999).

Na imagem abaixo (figura 3) é possível observar a correlação direta entre IDH (índice de desenvolvimento humano) e a incidência desse tipo de câncer em 2012. O IDH é classificado entre zero e 1. Países altamente desenvolvidos apresentam IDH entre 1 e 0,808; países desenvolvidos apresentam IDH entre 0,790 e 0,700; países com desenvolvimento médio apresentam IDH entre 0,698 e 0,556; países com desenvolvimento baixo apresentam IDH entre 0,540 e zero.

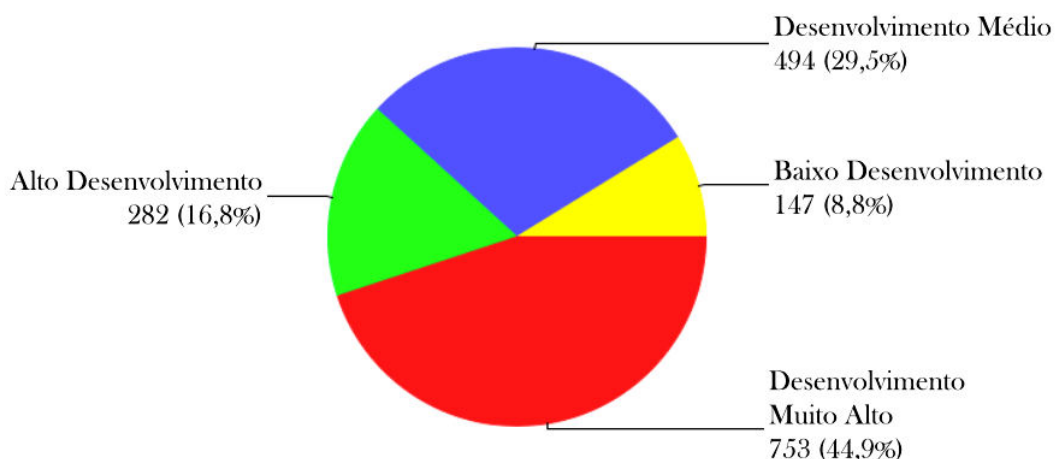


Figura 3: Representação da correlação entre o número estimado de casos (×1000) do câncer de mama e o índice de desenvolvimento humano (IDH) em todas as faixas etárias.; Imagem modificada a partir de: OMS¹ - Cancer Fact Sheet <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>; legenda conforme <<http://hdr.undp.org/sites/default/files/hdr14-summary-en.pdf>>.

Entretanto, tal como nas demais neoplasias, o desenvolvimento e estabelecimento deste tipo de câncer está relacionado com fatores de risco diversos, como:

- Estilo de Vida = ex.: sedentarismo, alimentação e estresse (WU *et al.*, 1996; WILLIAMS & HORD, 2005);
- Herança Genética = especialmente parentes de primeiro grau acometidos antes dos 50 anos;
- Idade = há probabilidade crescente de adoecer entre os 35 e os 50 anos de idade;

- Tipo de Nutrição = ex.: dieta altamente calórica, rica em proteínas e gordura de origem animal, carne vermelha e carnes processadas, gorduras totais, além de uma alimentação pobre em frutas e hortaliças (KEY *et al.*, 2003; KRONE & ELY, 2005; STOLL, 1999; ALLEN *et al.*, 2002; PRENTICE *et al.*, 2006);
- Consumo de Bebidas Alcoólicas = o risco aumenta 7% para cada porção de álcool ingerida (SMITH-WARNER *et al.*, 1998; HAMAJIMA *et al.*, 2002);
- Características Hormonais = ex.: menarca precoce, uso de anticoncepcional oral, irregularidade do ciclo menstrual, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal);
- Características Reprodutivas = ex.: nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos e número de filhos), assim como;
- Fatores Ambientais, dentre outros (INCA, 2014).

Portanto, é possível reduzir alguns dos fatores de riscos do câncer de mama com medidas relativamente simples, como ter um estilo de vida salutar: adotando uma dieta saudável (castanhas, alimentos integrais, vegetais, frutas); manter peso baixo, exercitar com regularidade; evitar a ingestão de bebidas alcoólicas e não fumar (OMS³, 2009).

Ademais, pacientes cujo câncer mamário foi detectado em estágios iniciais, apesar de receberem tratamento menos agressivo, ainda assim sofrem pela intoxicação secundária desencadeada por quimio ou radioterapias. Em virtude disso, esses pacientes são afetados por fadiga, ansiedade e desânimo, dentre outros quesitos. Os enfermos podem perder a qualidade de vida e acabam sem saber o que podem ou não fazer e quais passam a ser os seus limites físicos (TEMPLETON *et al.*, 2013).

Portanto, o câncer de mama é um problema de saúde pública, haja vista que o Instituto Nacional do Câncer estima que, por ano, ocorram quase 3 milhões de novos casos de câncer de mama em todo o mundo (INCA, 2014), o que corresponde a 22% dos novos casos de neoplasias em mulheres, anualmente.

Além disso, o Instituto Nacional do Câncer constatou que no ano de 2011, apenas no Brasil, faleceram 13.345 pessoas acometidas por câncer de mama. Apesar da sobrevivência global ser de 61%, decorridos cinco anos, no Brasil a taxa de mortalidade é elevada em reflexo das detecções tardias. Aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda per capita.

No Brasil a previsão foi de mais de 576 mil novos casos de câncer de mama para 2014 (INCA^{2e4}, 2014). Esta alta incidência não se deve unicamente ao fator de que mais

peessoas sejam acometidas a cada ano, mas também reflete o desenvolvimento tecnológico do setor de equipamentos utilizados na saúde, assim como a informatização dos sistemas de saúde (o que permite registrar e veicular mais números de casos do que se tinha anteriormente).

1.3. LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO - MDA-MB-231

A linhagem de células de adenocarcinoma invasivo de mama (MDA-MB-231) utilizada neste estudo é proveniente de tecido epitelial humano, derivado de sítio metastático de efusão pleural. O indivíduo que originou a linhagem era do sexo feminino, caucasiana e possuía 51 anos de idade. Trata-se de uma estirpe com cariótipo do tipo aneuplóide, onde os cromossomos normais N8 e N15 encontram-se ausentes, sendo que a contagem cromossômica aproxima-se da triploidia, uma vez que onze rearranjos cromossômicos estáveis foram identificados, mas em sua maioria apresentam características triplóides (ATCC², 2014).

Diversos genes (IGFBP6, IRS1, IGFBP4, IGFBP2, WNT7B, IGFBP5 e IGF1R) encontram-se com expressões alteradas nesta linhagem (PACHER *et al.*, 2007; ATCC^{1e2}). Dentre as mutações e alterações metabólicas da MDA-MB-231 houve a aquisição de potencial migratório, através do qual células desta cepa são capazes de projetar pseudópodes (figura 4) e degradar a matriz extracelular para movimentar-se (WOLF & FREIDL, 2009).

Ademais, esta linhagem de adenocarcinoma estrógeno-independente (SIMARD & GINGRAS, 2001; RICHARDS *et al.*, 2002) expressa receptores de membrana EGF (fator de crescimento epidermal), TGF- α (fator de crescimento transformador/tumoral alfa) (ATCC^{1e2}), é capaz de induzir a neoangiogenese (ZHU *et al.*, 2011) e há também a produção excessiva de proteases (OVERALL, 2006). Todos os fatores aqui mencionados são evidências bioquímicas da agressividade e do potencial metastático dessa linhagem.

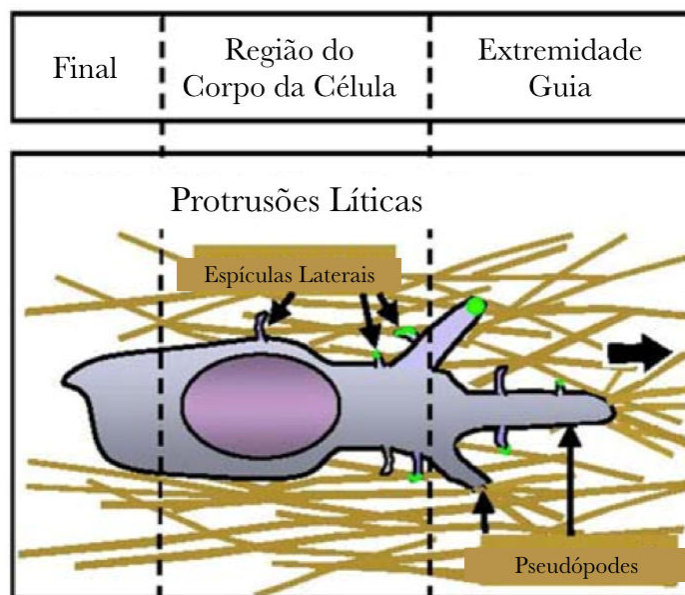


Figura 4: Ilustração da movimentação de uma célula MDA-MB-231 através de seus pseudópodes (projetados pela porção dianteira da célula) e espículas laterais ou protrusões líticas (projetadas do corpo da célula). Imagem adaptada de WOLF & FRIEDL, 2009.

1.4. PAPEL DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Na atualidade, as estratégias médico-farmacêuticas em torno do (adeno)carcinoma de mama consistem na realização de: cirurgias, radioterapias, quimioterapias e terapias sistêmicas adjuvantes, como descrito no tópico "Considerações Gerais e Importância do Estudo Proposto" (1.1).

Tendo em vista a diversidade e severidade de sinais e sintomas indesejados causados pelos tratamentos disponíveis na medicina atual, torna-se evidente a crescente necessidade do avanço para novas técnicas, tratamentos e desenvolvimento de moléculas para o combate e prevenção ao câncer.

Grupos de pesquisas na área farmacológica têm se dedicado a estudar moléculas bioativas em plantas que compõe a dieta humana (hortaliças, vegetais, oleaginosas, verduras e leguminosas). Tais compostos orgânicos vêm ganhado espaço dentro de diversas linhas de pesquisa relacionadas a neoplasias malignas, visto que se sabe da relação indireta entre a ingestão destes tipos de alimento com a baixa incidência de câncer (JOANITTI *et al.*, 2006; TANAKA *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos evidenciam que há uma correlação inversa entre o consumo de compostos bioativos e a incidência de câncer de mama, contudo, ao contrário do que afirma o conhecimento popular, os fatores genéticos têm menos poder

sobre essa vulnerabilidade/proteção, já que pessoas de regiões com alimentação tradicionalmente "verde" ao imigrar e adotar o estilo de vida do local tornam-se tão suscetíveis ao câncer quanto os indivíduos locais (JOANITTI *et al.*, 2011).

Por conseguinte, encontramos diversos complexos com promissora atividade antitumoral e baixa toxicidade, como: Inibidores de Protease (JOANITTI *et al.*, 2006; JOANITTI *et al.*, 2011; JOANITTI *et al.*, 2010), Organoselenados (MIORELLI, 2006; ESTEVANATO *et al.*, 2012), Flavonoides (SEELINGER *et al.*, 2008; TANAKA *et al.*, 2012), Indóis (AGGARWAL & ICHIKAWA, 2005; BALDWIN & LEBLANC, 1992; BELL *et al.*, 2000) e Carotenóides (TANAKA *et al.*, 2012; ROWAN, 2013).

Esta tendência da ciência moderna ao estudo de compostos disponíveis em vegetais comestíveis deve-se à sua abundante biodisponibilidade e baixa citotoxicidade contra células normais, o que torna os fitonutrientes quimioterápicos de amplo espectro em potencial para as mais diversas aplicações biomédicas e biotecnológicas.

Como evidenciado por TANAKA e colaboradores (2012), os fatores de risco relacionados à alimentação têm uma influência até mesmo maior que o tabagismo e muito maior que os riscos ocupacionais relacionados ao desenvolvimento do câncer e sua mortalidade. Portanto, torna-se evidente a necessidade de uma dieta balanceada e diversificada para a manutenção da saúde e prevenção da doença.

Ademais dos grupos de macromoléculas já citadas, evidenciaremos ao longo deste trabalho os Inibidores de Serinoproteases (ISp), cuja representatividade biológica é ampla, uma vez que esta categoria de enzimas e seus respectivos inibidores encontram-se amplamente dispersos entre os seres vivos, sendo encontrados em quase todos eles com participação em importantes e distintos processos fisiológicos.

1.5. Inibidores BBI e o Câncer

Os inibidores de proteases encontram-se biodispersos em animais, plantas e microrganismos, onde atuam como reguladores de cascatas metabólicas, sendo a classe dos inibidores Bowman-Birk uma das mais amplamente estudadas. Identificada em diversos tipos de leguminosas (BIRK, 1985), esta categoria também está presente em grãos (ex.: lágrima de Jó ou semente de coix e semente de milho ou rabo de raposa), no abacaxi, gérmen de trigo, cevada e arroz.

Esta família é caracterizada por apresentar dois sítios de inibição (Lys ou Arg e Phe ou Leu), o que as torna capazes de associarem, respectivamente, com a tripsina e quimotripsina (RIBEIRO *et al.*, 2009; KOBAYASHI, 2013). Contudo, as proteínas

capazes de inibir a tripsina concentram-se mais no Reino Plantae, especificamente nas sementes não germinadas, onde desempenham uma função de defesa contra pragas (XAVIER-FILHO & VENTURA, 1988).

Os inibidores de protease Bowman-Birk podem ser encontrados em grupos de sementes monocotiledôneas e dicotiledôneas e com localização em distintos órgãos (tubérculos, folhas e frutos) por apresentarem funções distintas, conforme seu organismo de origem.

Em seu principal e mais abundante local de origem, nos vegetais, os ISp_s apresentam numerosas funções, como: regular as proteólises do estágio germinativo; atuar como proteínas de reserva; regular o ciclo celular; e proteger a integridade da planta por meio da inibição da atividade catalítica das proteases de fungos, bactérias e insetos fitotrópicos, assim como inibir as enzimas digestivas de predadores ou superestimular a formação de enzimas, promovendo autodigestão do parasita (SILVA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.* 2014).

Estruturalmente esses inibidores apresentam baixa massa molecular (variando entre 7 e 10 kDa) e apresentam entre 5 e 7 ligações dissulfeto, o que lhes confere grande estabilidade em microambientes distintos, assim como elevada termoestabilidade. Diferentemente de outros tipos de moléculas, seu centro apresenta aminoácidos hidrofílicos, ao passo que sua superfície é hidrofóbica, o que favorece a tendência de agregação dessas macromoléculas (BODE & HUBER, 1992; FREITAS *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 1999; FRANCO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005; JOANITTI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2014).

A ação de inibidores da família Bowman-Birk (BBI) é inibir simultaneamente quimotripsina e tripsina. Todavia, estudos indicam que o efeito anticarcinogênico pode estar mais relacionado ao sítio de quimotripsina (JOANITTI, 2012; KENNEDY, 1998; YAVELow, 1985).

Os ISps endógenos, conhecidos por serpinas, estão relacionados com vários tipos de reações à agravos sofridos pelo organismo. Dentre elas podemos destacar processos de reparo tecidual devido a lesões e inflamação.

Contudo, tais moléculas estão intimamente ligadas ao desenvolvimento/desencadeamento do transcurso neoplásico, ou seja, a ausência ou deficiência de tais inibidores leva o organismo à formação facilitada de processos inflamatórios que podem evoluir a tumores (BAUMAN *et al.*, 2002).

Sabe-se que essas moléculas apresentam ação direta sobre a regulação gênica, por isso seus inibidores são capazes de intervir indiretamente no processo de transformação maligna da célula (JOANITTI *et al.*, 2006).

1.6. INIBIDOR DE TRIPSINA/QUIMOTRIPSINA DE *VIGNA UNGUICULATA* - BTCl

O BTCl, objeto de estudo do presente trabalho, é um inibidor de proteases purificado de sementes da leguminosa *Vigna unguiculata*, popularmente conhecida como feijão de corda (VENTURA & XAVIER-FILHO, 1966; JOANITTI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 1999; VENTURA *et al.*, 1981).

Este inibidor da família Bowman-Birk, purificado primeiramente por VENTURA e XAVIER em 1966, é composto por 83 resíduos de aminoácidos de uma única cadeia peptídica e cuja superfície é hidrofóbica, com 9.084 Da, contendo dois sítios reativos independentes (vide figura 5), um para inibição de tripsina e outro para quimotripsina (FREITAS *et al.*, 1997).



Figura 5: Modelo computacional do BTCl. Em destaque encontram-se os sítios ativos da molécula. Imagem de Freitas *et al.*, 1997.

A conformação globular densa e rígida do BTCl é devida às sete ligações dissulfeto desta macromolécula que conferem estabilidade em faixa ampla de pH - 3 até 11 - e também em temperaturas elevadas - termoestável em até 95 °C por 60 minutos - mantendo, ainda, atividade de inibição constante (SILVA *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2005). Tais características físico-químicas podem favorecer o potencial farmacológico do BTCl.

Estudos de microscopia de força atômica (BARBOSA *et al.*, 2007) indicaram que a alça onde encontra-se o subdomínio de atividade anti-tripsina é rígida em função de sua especificidade, ao passo que aquela que corresponde ao sítio anti-quimotriptico é

caracterizada por sua flexibilidade, o que intensifica a propensão à auto-associação deste inibidor de serinoproteases.

Com a utilização de outras técnicas a ligação da tripsina e da quimotripsina ao BTCI foi caracterizada como um processo endotérmico, espontâneo, exergônico e entrópico (FREITAS *et al.*, 1999). Ademais, seus sítios reativos são capazes de acoplarem proteinases cognatas (BARBOSA *et al.*, 2007). Contudo, o complexo ternário (~55 kDa) é composto por apenas uma molécula de cada categoria, ou seja (ESTEVEVES *et al.*, 2007):

Tripsina/Cognato+BTCI+Quimotripsina/Cognato=Complexo Ternário

É por meio da formação dos complexos binários/ternários que este ISp inibe as atividades proteolíticas da tripsina e da quimotripsina.

Devido à sua superfície com resíduos de aromáticos e outros hidrofóbicos, o BTCI apresenta tendência à auto-oligomerização por meio de ligações não covalentes, o que lhe confere diferentes formas de arranjo. Em concentrações a partir de 0,082 g/dl existe a proporcionalidade monômero-hexâmero. Entretanto, sua apresentação também pode ser nas formas de dímero e trímero, embora esses agregados interpostos surjam em índices muito menores. Portanto, dependendo da concentração, encontram-se multímeros em solução (VENTURA *et al.*, 1981; SILVA *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 1997).

O BTCI já foi caracterizado como tendo capacidade natriurética em rim perfundido de rato, tem ação sobre a guanilina cujo efeito renal é estimular natriurese e caliurese. Devido à existência de aminoácidos aromáticos na guanilina, na sua forma bioativa, a quimotripsina é capaz de clivá-la. Por sua vez, o BTCI apresenta dois sítios reativos independentes capazes de interagir com tripsina e quimotripsina simultaneamente.

Em função deste último, o referido inibidor é capaz de intervir no ciclo natriurético ao bloquear a quimotripsina, impedindo, conseqüentemente a degradação da guanilina. Portanto, o efeito do BTCI sobre o metabolismo renal resume-se em potencializador de natriurese induzida por guanilina (CARVALHO *et al.*, 2008).

Seguindo a mesma linha de estudo, o efeito do BTCI na fisiologia cardiovascular também foi constatado, uma vez que a associação com a bradicinina (responsável pela constrição e vasodilatação dos músculos lisos) aumenta a meia vida desta molécula, pois por tratar-se de um inibidor de serinoproteases é capaz de prevenir a degradação proteolítica do vasorregulador em questão (ÁLVARES *et al.*, 2014).

Ademais, o BTCI apresenta atividade de supressão tumoral – *in vitro* – já reportada, assim como capacidade de prevenir o câncer de pele em camundongos – *in vivo* – (JOANITTI *et al.*, 2010; JOANITTI, 2012) e atoxicidade a células de fibroblasto, eritrócitos e mama normais (JOANITTI *et al.*, 2008).

Os distúrbios de ciclo celular que desencadeiam os mais diversos tipos de câncer estão relacionados à via ubiquitina-proteassoma. Recentemente, o BTCI foi caracterizado como potente inibidor do proteassoma 20S, sendo responsável pela inibição de sítios *caspase-like* (menos afinidade), *tripsina-like* (maior afinidade) e *quimotripsina-like* (SOUZA, 2010).

Os inibidores de proteases apresentam especial destaque como agentes terapêuticos, devido à sua capacidade de intervir em processos essenciais para o desenvolvimento de neoplasias, inibindo enzimas chaves nesses processos, principalmente aquelas do tipo *quimotripsina-like* (KENNEDY, 1998; DERYUGINA *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que as propriedades físico-químicas do BTCI podem favorecer sua utilização farmacêutica no tratamento complementar de pacientes que necessitam tratar-se com técnicas como a braquiterapia, medicina nuclear e a radioterapia. O potencial anticarcinogênico e preventivo do BTCI quanto ao câncer de mama (MCF7) foi caracterizado pelas alterações na proliferação e viabilidade por meio de interferência no ciclo celular (JOANITTI *et al.*, 2010).

Além disso, foi mostrado, em estudos posteriores (JOANITTI, 2012), o efeito preventivo do BTCI contra câncer de pele (não-melanoma) induzido por agentes químicos em camundongos. Um estudo preliminar, *in vitro*, desenvolvido em um projeto TCC, mostrou que o BTCI interfere no desenvolvimento de células de carcinoma oral. Nesse caso, o BTCI inibiu >90% da viabilidade de células da linhagem OSCC-3 (XAVIER-REIS, 2011).

Este inibidor, caracterizado como potencial agente anticarcinogênico, tem sido alvo de estudos há mais de 40 anos, por pesquisadores do laboratório de Biofísica (IB/CEL), em várias linhas do conhecimento, incluindo desde a caracterização estrutural, funcional e de aplicação tecnológica, farmacêutica e biomédica.

Visando a aplicação biotecnológica do BTCI projetos de nanoencapsulamento foram desenvolvidos: associando este inibidor à nanopartículas de maghemita recobertas por dextrana (MagDex) (XAVIER, 2012) ou à nanopartículas poliméricas de

quitosana (OLIVEIRA, 2012). As partículas de MagDex não afetaram os sítios reativos da molécula (XAVIER, 2012), ao passo que as partículas de quitosana resultantes foram estáveis e não comprometeram a função (atividade de inibição contra quimotripsina e tripsina) deste BBI, além de liberarem gradualmente o BTCl encapsulado (OLIVEIRA, 2012).

Portanto, o estudo desse inibidor constitui uma linha de pesquisa consolidada e com ampla área de aplicação. No que se refere aos ensaios de aplicação farmacológica, os efeitos desse inibidor estão sendo avaliados inicialmente em um sistema controlado (*in vitro*). No entanto, estudos em modelos biologicamente compatíveis precisam ser desenvolvidos. Posteriormente, será possível avaliar os efeitos desse inibidor na fase clínica (CASTANO *et al.*, 2004).

1.7. Espécies Reativas de Oxigênio - EROS

Os radicais livres são constituídos pela existência de elétrons desemparelhados em compostos químicos, sejam eles átomos, íons ou moléculas (BEDARD & KRAUSE, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010) e classificam-se em dois grupos, espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de oxigênio (EROS). O segundo grupo será o de maior relevância para este trabalho.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) estão envolvidas em mecanismos relacionados ao metabolismo celular, onde os inibidores de proteases podem desempenhar papéis importantes na regulação dessas espécies reativas, uma vez que estas estão envolvidas em regulações metabólicas (multiplicação celular, senescência e apoptose, dentre outras) e na defesa do hospedeiro (atividade contra patógenos) (JOANITTI *et al.*, 2006; BEDARD & KRAUSE, 2007).

Contudo, o excesso de EROS ocasionado pelo aumento de sua produção ou resultante da diminuição de sua degradação gera estresse oxidativo (PARAVICINI & TOUYZ, 2006), que por sua vez tem como consequência a interação de EROS com metabólitos, organelas e o DNA celular, produzindo mediadores duráveis (e mais letais que EROS em si). Quanto maior a desregulação da produção/manutenção de EROS, maiores os riscos de ocorrer a oxidação maciça de componentes celulares, independente do mecanismo de sustentação.

A ação de antioxidantes em contrapartida à atuação de EROS é uma maneira de manter este ciclo auto-sustentável, contudo quando isso não ocorre as respostas pró-

inflamatórias acentuam-se, resultando em consequências de longo prazo, dentre as quais estão senescência precoce, doenças inflamatórias e câncer (WILCOX, 2005).

EROS atuam como segundo mensageiros intra e extracelulares, suas ações mediadoras ocorrem ao alterar o estado redox de algumas proteínas. Todas as espécies reativas de oxigênio são resultantes de alguma modificação da molécula de oxigênio, contudo suas diferentes formas de apresentação possibilitam ou impedem sua ação em determinadas regiões da célula devido às suas novas formatações moleculares.

Portanto, distintas EROS são utilizadas para ativar diferentes cascatas de sinalização e dentre seus alvos estão: MAP quinases, responsáveis por regular a proliferação, diferenciação e morte celular; fofatases, encarregadas de modificações pós-traducionais; matriz extracelular; DNA, desencadeamento da expressão de genes inflamatórios; proteínas do ciclo celular e canais de íons, dentre outros (PARAVICINI & TOUYZ, 2006).

Os efeitos patológicos citados podem ocorrer, quando sua produção (EROS) é exacerbada, porque as espécies reativas de oxigênio reagem com diversos tipos de biomoléculas (nucleotídeos, proteínas e lipídeos, por exemplo) presentes no microambiente interno da célula. Sua interação acaba por modificar a funcionalidade dos mesmos, causando citotoxicidade, alergias, mutagênese e até morte celular, dependendo da proporção da exposição (MATÉS *et al.*, 1999).

Entretanto, a formação de EROS nem sempre é crônica ou patológica, mas se houver superprodução destas espécies e a isto estiver associada uma falha na proteção antioxidante, haverá o desencadeamento de eventos nocivos às células, tecidos e, conseqüentemente, ao organismo. Danos e lesões, reversíveis e irreversíveis podem iniciar o processo de morte celular.

Contudo, diferentes cascatas são desencadeadas conforme o estímulo recebido, suscitando a respectiva morte celular (tabela 1). As vias de morte celular citadas diferenciam-se por fatores como a ativação ou não de vias inflamatórias, pelo tipo de moléculas envolvidas, ganho ou perda de volume celular, permeabilização de membrana, condensação ou falta de condensação da cromatina, dentre outras características (SCHWEICHEL & MERKER, 1973; KUWANA & NEWMeyer, 2003).

Contudo, neste trabalho o enfoque principal será dado na apoptose (figura 6). Coordenada por um conjunto de vias bioquímicas, a apoptose é uma resposta ativa a

estímulos fisiológicos que levam à morte e eliminação celular sem ativação de vias inflamatórias ou alteração do microambiente celular.

Tabela 1: Comparação dos tipos de morte celular.

Características	Apoptose	Autofagia	Necrose
Morfologia	condensação e marginalização da cromatina; retração de pseudópodes; fragmentação nuclear; redução do volume celular e nuclear; permeabilização da membrana mitocondrial; formação de corpos apoptóticos.	vacuolização autofágica, degradação do material citoplasmático por autofagossomos, formação de autolisossomos.	ganho de volume celular e de organelas, ruptura da membrana plasmática, espalhamento do conteúdo citoplasmático no meio extracelular, permeabilização da membrana mitocondrial, permeabilização da membrana lisossomal.
Sinalização Celular	normalmente é um processo não imunogênico; superprodução de EROS; ativação das proteínas Bax, Bak e Bid (da família Bcl-2); externalização/exposição da fosfatidilserina; processo dependente de ATP; degradação regulada do DNA.	proteína LC3 (LC3-I e LC3-II) e suas isoformas; mediação autofágica por meio das chaperonas (CMA)LAMP-2A, reconhecimento de chaperonas nos lisossomos.	desencadeada por TNFR1, Fas/CD95 e TRAIL-R (receptores de morte celular), assim como por TLR3 e TLR4 (TOLL-like), hiperativação de PARP-1, diminuição dos níveis de ATP; superprodução de EROS.
Enzimáticas	ativação de caspases; nucleases EndoG, DFF40 e NM23-H1.	expressão da família de cinases Atg; PI3K gera PIP3 e são responsáveis pela modulação do ciclo celular.	cinase RIP1, ativação de calapinas e catepsinas por excesso de Ca ²⁺ .
Observação	Não é sinônimo de morte celular programada. Existem subtipos de apoptose dependendo da via de iniciação. Pode ocorrer sem fragmentação de DNA. Processo celular individual. Fagocitose dos corpos apoptóticos.	Não ocorre condensação de cromatina. Pouca ou nenhuma relação com fagócitos. Não apresenta um ponto de morte irreversível claro, ou seja, é uma morte pró-sobrevivência. Visa a reciclagem de componentes.	Pode ser um processo regulado, ao contrário do que se acreditava até poucas décadas atrás. Caracterizada pela ausência de um perfil apoptótico ou autofágico. Processo celular grupal (células adjacentes). Resposta inflamatória e fagocitose, <i>in vitro</i> .
Outros tipos de Morte (caracterizáveis por fatores não morfológicos)	Piroptose, Cornificação, Catástrofe Mitótica, Entose, Pironecrose, Paraptose, Degradação Valeriana, Excitotoxicidade, Anicoose.		

CHIELA, 2011; GALLUZZI *et al.*, 2007; KROEMER *et al.*, 2009; GRIVICICH *et al.*, 2007.

Suas principais mudanças morfológicas são: retração celular, picnose nuclear, perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, condensação da cromatina, cariorrexe, fragmentação internucleossômica do DNA e formação de corpos

apoptóticos (PARAOLIN & REASON, 2001; ORRENIUS *et al.*, 2003; FULDA & DEBATIN, 2006), como descrito na tabela 1.

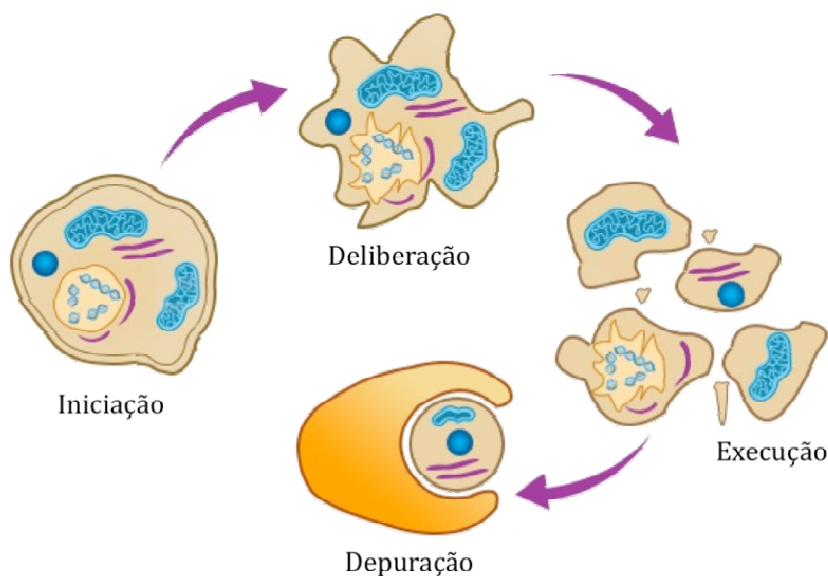


Figura 6: Etapas da célula em apoptose. Na iniciações ocorre a redução do volume celular; A etapa da deliberação é caracterizada morfologicamente pelos prolongamentos da membrana celular (*blebbing*); Por ocasião da execução são formados os corpos apoptóticos; Na etapa de depuração ocorre a fagocitose dos corpos apoptóticos. Imagem modificada a partir de: <<http://www.buzzle.com/images/diagrams/apoptosis-morphological-changes.jpg>>.

Esta cascata é controlada por proteínas reguladoras da família Bcl-2, cuja função é regular as caspases 2 e 3, que estão diretamente relacionadas ao desencadeamento da apoptose, responsáveis pelas modificações morfológicas deste tipo de morte celular (SWANTON *et al.*, 1999; GALLUZZI *et al.*, 2007; KROEMER *et al.*, 2009).

A morte celular por apoptose ocorre em etapas:

- a. **Iniciação**: é a fase em que ocorre algum tipo de dano, intrínseco ou extrínseco, ao DNA ou à célula. Na iniciação extrínseca, a sinalização ocorre via receptores de morte na superfície da membrana citoplasmática da célula. Os ligantes destes receptores atuam como ativadores extracelulares de apoptose (WANG & YOULE, 2009).
- b. **Deliberação**: ocorre aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de procaspases 2, 3 e 9 pela mitocôndria, assim como do citocromo C, além da diminuição da produção de ATP e do aumento de EROS. Quando os receptores de morte reconhecem um ligante extrínseco específico (TNF e Fas-L), seus domínios de morte interagem com as proteínas adaptadoras FADD (Fas-

associated death domain)/MORT1 que recrutam a caspase-8, responsável por ativar a caspase-3, levando à fase de execução (VALENTE, 2011).

- c. Execução: as moléculas de citocromo C que escoam para o citoplasma celular, em consequência da ruptura da mitocôndria, ligam-se às Apaf-1 (fator apoptótico de ativação de protease) e à procaspase 9, formando o apoptossomo, capaz de ativar a caspase 3. Com isso, a célula sofre modificações em sua morfologia como efeito da atuação das caspases e passa pela fragmentação do DNA (MEIRA, 2011).
- d. Depuração: remoção dos corpos apoptóticos por fagócitos (como neutrófilos e macrófagos), sem ativação inflamatória, através da fagocitose (CAMPAGNARO, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Os inibidores da Família Bowman-Birk (BBI) vem sendo estudados quanto ao potencial em aplicações tecnológicas nos setores da agricultura e da biomedicina. Nesses domínios destacam-se os inibidores com potencial para controle biológico de plantas e com ação preventiva e terapêutica contra diversos tipos de câncer.

Recentemente foi reportado o efeito anticarcinogênico do BTCI, objeto deste estudo, extraído de sementes de feijão-de-corda. A associação desse inibidor com células de câncer mamário (MCF7) alterou a proliferação e viabilidade das mesmas, suprimindo o câncer por meio da interferência no ciclo celular causando variações:

- Citostáticas: parada do ciclo celular nas fases S e M/G2, possivelmente por meio da expressão e acúmulo de proteínas reguladoras do ciclo celular;
- Citotóxicas: redução significativa e dose-dependente da viabilidade celular por meio de apoptose induzida por BTCI e permeabilização da membrana de lisossomos;

"Efeitos citotóxicos em células de câncer induzidos por ISp Bowman-Birk não são frequentemente reportados na literatura. A maioria dos trabalhos publicados atribuíram que o tratamento de células de câncer com ISp Bowman-Birk tem efeitos significativos sobre a proliferação celular e pouco ou nenhum efeito de morte celular. Em contraste, o BTCI foi capaz de induzir tanto a redução de proliferação celular como efeitos citotóxicos nas células de câncer de mama."

(JOANITTI *et al.*, 2010)

Outra característica que contribui para o uso do BTCI como agente anticarcinogênico é que este inibidor não intervém na viabilidade de células mamárias normais. Resultados preventivos do BTCI e de outros BBIs também foram observados sobre diversos tipos de câncer, como a ação anti-inflamatória, prevenção da carcinogênese e a radioproteção (JOANITTI *et al.*, 2010; JOANITTI *et al.*, 2012; KOBAYASHI, 2013).

Além disso, estudos posteriores demonstraram os efeitos preventivo e terapêutico do BTCI contra o câncer de pele (não-melanoma), induzido por agentes químicos em camundongos. O grupo não tratado apresentou incidência das lesões em 83,3% dos animais, ao passo que do grupo de animais tratados com BTCI foram apenas 50%. O número de lesões no grupo não tratado foi 12, enquanto no tratado o número foi 7 e o volume das lesões também foi menor no grupo tratado.

Ademais, os camundongos tratados com BTCI tiveram menos necrose, figuras mitóticas, hiperqueratose, neoangiogênese, desmoplasia, hiperplasia, perda de polaridade, células multinucleadas, eosinofilia e acnatólise (JOANITTI *et al.*, 2012). O modelo utilizado apresenta características fenotípicas similares às do mesmo tipo de câncer em humanos, sugerindo que tal inibidor poderia apresentar efeitos semelhantes no *Homo sapiens*.

Tendo em vista a elevada incidência anual deste tipo de câncer no Brasil e no mundo, bem como a demanda por medicamentos alternativos contra essa doença, o desenvolvimento de projetos que caracterizem novas moléculas com potencial anticarcinogênico é fundamental para a saúde pública. Portanto, a aplicação biotecnológica de agentes antitumorais de amplo espectro e com efeitos colaterais menos severos que os atuais seria benéfica para indivíduos acometidos por diversos tipos de neoplasias.

Aproximadamente 20% das neoplasias de mama são diagnosticados em mulheres com menos de 50 anos de idade e 43% em mulheres com 65 anos ou mais, sendo que 61% destes casos são detectados em fase *in situ* (DESANTIS *et al.*, 2014). Contudo, a sobrevida e o prognóstico destes indivíduos depende do desdobraimento, ou não, de uma metástase. Os principais sítios de metástase desta neoplasia, que é a mais comum em mulheres, são: ossos, cérebro, fígado e pulmões (MBC Alliance, 2014).

A sobrevivência em relação a esta patologia depende da idade e estágio em que o sujeito foi diagnosticado, como é possível observar na figura 7. A sobrevida de 5 anos melhorou nas últimas décadas, mas apenas para cânceres de mama positivos para receptores de estrogênio (ER⁺). No entanto, não houve melhora na sobrevida de pacientes com neoplasia invasiva negativa para receptores de estrogênio (ER⁻) (DESANTIS *et al.*, 2014), o que reflete o perfil da linhagem MDA-MB-231 e demonstra a severidade desta adenocarcinoma.

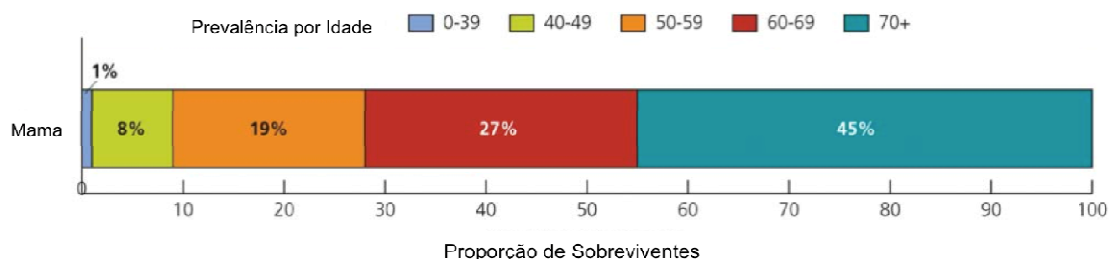


Figura 7: Distribuição por idade dos sobreviventes de câncer de mama invasivo, no Estados Unidos, em 2014. Apenas do sexo feminino. Imagem modificada a partir de: DESANTIS *et al.*, 2014.

O número real de pessoas com câncer de mama metastático não é preciso, visto que a maior parte dos diagnósticos de metástase nesta neoplasia ocorrem em indivíduos que haviam recebido um diagnóstico prévio de câncer, mas recorreram após o tratamento. Assim, ente 20-30% dos diagnósticos iniciais de câncer de mama evoluirão para metástase. Pacientes acometidos por câncer de mama metastático sofrem de dores crônicas em 70-90% dos casos e a fadiga também é um sintoma marcante (80%). Além disso, mais de 75% dos sujeitos sofrem, em algum nível, de insônia (MBC Alliance, 2014).

Visto que apenas 1-10% dos recém diagnosticados, com metástase de câncer mamário (PAGANI *et al.*, 2010), são passíveis de cura com as técnicas e os medicamentos disponíveis na área de saúde atual, é essencial o desdobramento de pesquisas que visem o desenvolvimento e a caracterização de agentes terapêuticos adjuvantes capazes de aumentar os índices de restabelecimento.

Portanto, a molécula escolhida para esse estudo *in vitro* é o BTCl, um inibidor que já foi caracterizado como potencial agente anticarcinogênico contra o câncer de mama não invasivo, câncer de pele não melanoma e preliminarmente como agente contra o câncer de boca. Essa pesquisa pode apontar o BTCl como um agente anticarcinogênico de amplo espectro e colaborar para o desenvolvimento de tratamentos alternativos e/ou complementares contra o câncer de mama invasivo. Além do mais, este é o primeiro estudo a investigar os efeitos do inibidor BBI de *Vigna unguiculata* em células metastáticas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito citotóxico e/ou antiproliferativo do inibidor de serinoproteases *black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor* (BTCI) no adenocarcinoma mamário, *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito do BTCI na morte celular e progressão das células de câncer de mama invasivo, avaliando *in vitro*:

- A viabilidade celular;
- A modulação de ciclo celular;
- A atividade apoptótica e necrótica;
- A produção de espécies reativas de oxigênio.
- Além disso, aprimorar o método de purificação e rendimento do BTCI;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BTCI

Sementes de cowpea *Vigna unguiculata* (variedade Seridó) foram cedidas pela Universidade de Fortaleza, das quais parte destinou-se ao armazenamento e o restante à Estação de Biologia Experimental da Universidade de Brasília para o cultivo, que entre plantio, secagem e debulhamento dos grãos levou em torno de quatro meses.

Purificou-se o BTCI de acordo com VENTURA *et al.* (1971), como evidenciado na figura 8: o extrato bruto obtido de sementes de *V. unguiculata* foi posteriormente submetido a cromatografia de troca iônica (VENTURA & XAVIER-FILHO, 1966). A alíquota coletada passou por análise de espectrometria de massa para avaliar sua pureza antes de dar continuidade aos experimentos.

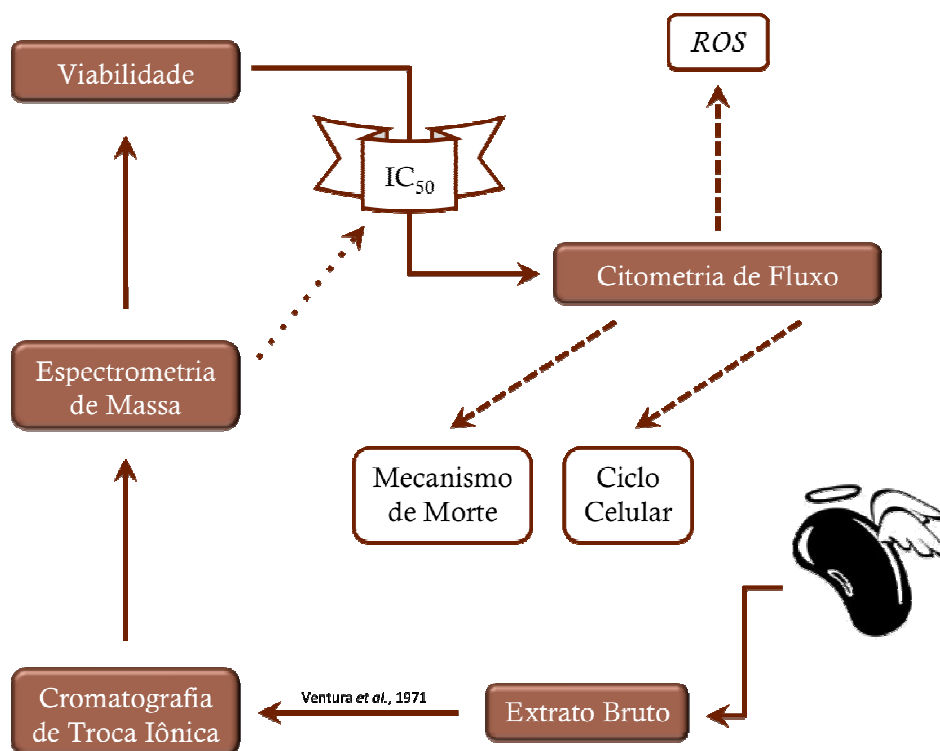


Figura 8: Fluxograma do desenho experimental.

4.1.1. EXTRATO BRUTO

A preparação do extrato bruto das sementes do feijão-de-corda foi realizada segundo o método de VENTURA *et al.* 1966, assim: as sementes secas e debulhadas

foram trituradas; a cada 500 g do pó resultante foram acrescentados dois litros de água destilada, assim como 200 µL de leupeptidase [0,1 M] e este preparado foi mantido sob agitação constante a 4 °C por 12 horas. A mistura, com adição de 500 mL de água destilada, foi homogeneizada durante 15 minutos, por meio de liquidificador; em seguida filtrou-se todo o material em tecido de algodão; o material retido na filtração foi descartado enquanto o filtrado foi submetido a centrifugação de 8000 g a 4 °C por 30 minutos.

O sobrenadante reunido foi submetido à precipitação com ácido tricloroacético para a concentração final de 2,5%. A suspensão foi filtrada em papel e o filtrado submetido à precipitação com sulfato de amônio, cuja concentração final foi de 50%. Em seguida, o material foi centrifugado a 8000 g a 4 °C durante 40 minutos e o *pellet* resultante foi ressuspenso e dissolvido em 30 mL de água destilada. O extrato bruto resultante foi dialisado contra água deionizada por 18 horas e estocado a -20 °C.

4.1.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A coluna de cromatografia preenchida com DEAE-cellulose utilizada neste estudo apresentava as dimensões de três centímetros e meio de largura por 23 centímetros de altura. A coluna foi ativada pela sequência de soluções de Água destilada com 0,02% de Azida Sódica, HCl [0,2 M], Água destilada com 0,02% de Azida Sódica, NaOH [0,2 M], Água destilada com 0,02% de Azida Sódica, 50 mL de Tampão Fosfato de Sódio Monobásico pH 7,3 [100 mM], 500 mL de Tampão Fosfato de Sódio Monobásico pH 7,3 [10 mM] com 0,04% de Azida Sódica.

A amostra, em Tampão Fosfato de Sódio Monobásico pH 7,3 [10 mM], foi aplicada na coluna - após centrifugação. A coluna foi lavada com Tampão Fosfato de Sódio Monobásico pH 7,3 [10 mM] com 0,02% de Azida Sódica após a aplicação da amostra. Através da aplicação de um gradiente linear de NaCl variando entre 0 e 0,8 M os primeiros 100 mL foram desprezados e as alíquotas eluídas de BTCI foram coletadas em frações de 3 a 4 mL por minuto, monitorando a presença de proteína por meio da leitura de absorvância em 280 nm.

O controle deste experimento foi feito por meio da leitura do Tampão Fosfato de Sódio Monobásico pH 7,3 [10 mM] sem proteína. As alíquotas com perfil análogo ao espectro do BTCI foram separadas para dialisar e concentrar utilizando o sistema Amicon[®] (*Stirred Ultrafiltration Cell*) da Millipore com filtros de celulose de 1 kDa.

Após a ultrafiltração as porções foram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizadas para posterior utilização.

4.1.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA - MALDI

A pureza do BTCI preparado foi analisada por meio da determinação de sua massa molecular por espectrometria de massa. Alíquotas de cada lote das amostras foram diluídas em matriz de ionização (5 mg de ácido-cyano-4-hidroxi-cinâmico, 200 μL de água nanopura, 250 μL de acetonitrila e 50 μL de TFA) e a mistura foi colocada em placa MSP Target 96 Polished para que então fosse inserida no equipamento MicroFlex da Bruker[®] para obter os espectros.

4.2. MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT

As células da linhagem MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. Estas células foram cultivadas em meio Leibovitz L15 (vide tabela 2) à 37°C na ausência de CO_2 . O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina.

Após a tripsinização e centrifugação, 100 μL das células foram plaqueadas na concentração de 10^5 células/mL em placas de 96 poços. Foram testadas as concentrações de 50 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM , 600 μM , 900 μM , 1,20 mM e 1,50 mM e o tempo de tratamento estabelecido foi de 24 horas.

Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas e incubadas apenas com meio de cultura suplementado. O sobrenadante da cultura celular foi retirado e armazenado em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise da produção de radicais livres (peroxidação lipídica). Foram adicionados 20 μL de MTT (5 mg/mL) às células, e estas incubadas por 2 a 4 horas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após este período, o meio foi removido e acrescentou-se 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi avaliada espectrofotometricamente a 595 nm no equipamento SpectraMAX M2. Para cada linhagem celular foram realizados três experimentos separadamente, ou seja, triplicatas.

Tabela 2: Composição do meio de cultura L-15 Leibovitz, fonte: <<http://www.cultilab.com.br/paginas/inftec1.6.html>>.

Sais Inorgânicos	mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	185
KCl	400
KH ₂ PO ₄	60
MgCl ₂ ·6H ₂ O	200
MgSO ₄	98
MgSO ₄ ·7H ₂ O	--
NaCl	8000
Na ₂ HPO ₄	190
Aminoácidos	mg/L
L-alanina	225
L-arginina (base livre)	500
L-asparagina.H ₂ O	125
L-cisteína (base livre)	120
L-glutamina	300
Glicina	200
L-histidina (base livre)	250
L-isoleucina	125
L-lisina	75
L-metionina	75
L-fenilalanina	125
L-serina	100
L-treonina	300
L-triptofano	20
L-tirosina	100
L-valina	200

Vitaminas	mg/L
Pantotenato de Cálcio	1
Cloreto de Colina	1
Ácido Fólico	1
Inositol	2
Piridoxina.HCl	1
Nicotinamida	1
Riboflavina	0,1
Tiamina	1
Outros Componentes	mg/L
D(+) galactose	900
Vermelho de Fenol	10
Piruvato de Sódio	550

A citotoxicidade do BTCI nas células MDA-MB-231 foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. Foram semeadas 5×10^3 células MDA-MB-231 por poço em placas de 96 poços e incubadas overnight a 37°C. Após sua adesão, as células

foram tratadas com as diferentes concentrações de BTCI sonicado por 2 minutos ou mantidas apenas em meio de cultivo, como controle. Após o período de tratamento (24h), os poços foram incubados com 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) por 4h, no escuro e a 37°C.

Em seguida, a solução de MTT foi retirada e foi colocado 200 µL de DMSO a cada um dos poços para a diluição dos cristais de formazam. As placas foram lidas a 595 nm no espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices – USA). O ensaio de MTT foi feito em triplicata para cada uma das concentrações utilizadas e em três experimentos independentes.

Este estudo, assim como os demais, foi realizado em triplicata. Os valores da concentração inibitória 50 (IC₅₀) para as células MDA-MB-231 foram calculados com base nos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular por MTT com o tratamento das células por 24h. Para tal, a porcentagem de células viáveis foi plotada contra a dose de tratamento em escala logarítmica. O valor de IC₅₀ foi calculado a partir da curva ajustada, por método não linear, utilizando o programa Origin, considerando uma equação de decaimento exponencial. Este cálculo também foi realizado utilizando o Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.3. ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Nos ensaios de citometria de fluxo foram utilizadas células MDA-MB-231 tratadas com 267,4 µM de BTCI (sonicado por 2 minutos antes do tratamento) por 24 h. Os dados foram coletados em triplicata e os resultados apresentados representam a média das três leituras realizadas pelo citômetro de fluxo.

É importante ressaltar que os histogramas e dot plots apresentados tem por objetivo apenas ilustrar o que foi observado durante as análises por citometria de fluxo, ou seja, as populações celulares e suas diferentes respostas de intensidade de fluorescência obtidas para cada amostra estudada.

4.3.1. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

O citômetro de fluxo utilizado nesta pesquisa foi o FACSVerse (BD[®]) acoplado a um computador. Foram adquiridos 30000 eventos de cada triplicata, sendo 10000 eventos por amostra. Tal equipamento possibilita o estudo complexo - informação quantitativa detalhada de cada célula - do tamanho, granularidade e fluorescência da partícula devido a seus sistemas integrados, assim como da correspondência

estequiométrica do marcador (Ex.: células em fase S terão mais DNA que aquelas em fase G1).

Após a tripsinização e centrifugação das células, as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 poços. A sonicação do BTCI por 2 minutos antes da incubação com as células foi adotada como procedimento padrão para evitar a agregação da molécula. Após o tratamento, as amostras foram tripsinizadas, centrifugadas por 10 minutos a 300 g sob refrigeração de 4 °C. A seguir, o pellet foi ressuspensionado em 100 µl de PBS e adicionou-se 900 µl de etanol 70% gelado por tubo, ficando assim por duas horas a 4°C. As amostras então passaram por centrifugação a 850 g durante 10 minutos.

O precipitado foi lavado com PBS e ressuspensionado em solução contendo 0,1% de Triton X-100, 100µg/ml de PI e 50 µg/ml de RNase livre de DNase em PBS e mantido a 37 °C por 10 minutos, protegido da luz. Para a análise em citômetro de fluxo, as células foram ressuspensionadas em PBS. Foram adquiridos 10.000 eventos e a análise dos dados foi realizada conforme parâmetros de ciclo celular do próprio programa. Os resultados foram expressos em porcentagem média de células nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S e G2/M.

4.3.2. AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE MORTE CELULAR

Após a tripsinização e centrifugação das células, as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 poços, com amostras em triplicata. As células foram lavadas duas vezes em PBS a 4°C, ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação e incubadas por mais 30 minutos com 1µg de anexina V-FITC e 18 µg/ml de solução de iodeto de propídeo (PI), como esquematizado na figura 9. Os canais de fluorescência utilizados foram:

- FL-1 para a Anexina-V/FITC;
- FL-2 para o Iodeto de Propídeo (PI).

As células para controle do kit foram separadas em três grupos:

- Controle Negativo, composto por células viáveis, não tratadas e não marcadas;
- Controle Positivo, células submetidas a fervura por 5 minutos para indução de morte. Composto por dois subgrupos:

- a. Marcadas com PI;
- b. Marcadas com Anexina-V/FITC.

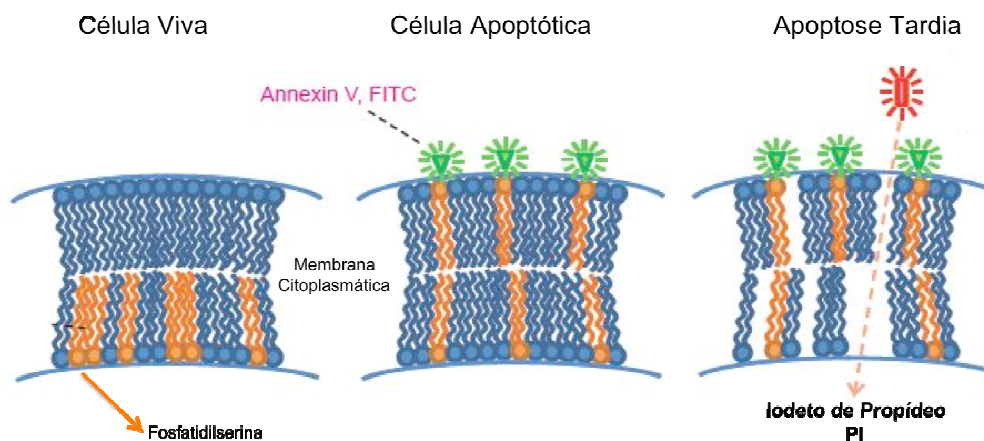


Figura 9: Esquema didático para compreensão do funcionamento da marcação com Anexina-V e do Iodeto de Propídeo para avaliação do mecanismo de morte celular. A translocação da fosfatidilserina da interface citoplasmática para a superfície extracelular favorece a marcação extracelular com a anexina, em células em estágios iniciais da apoptose. Ao passo que, células em apoptose tardia sofrem perda da integridade da membrana citoplasmática e isto possibilita a permeabilização do PI, cuja função como marcador é intercalar-se no DNA celular.

4.3.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO - PRODUÇÃO DE EROS

O kit de marcação utilizado para este experimento foi o *CellROX[®] Deep Red Reagent da Life TechnologiesTM*. Os reagentes permeáveis à membrana citoplasmática não são fluorescentes, contudo, sob condição de oxidação celular passam a emitir sinais de fluorescência intensos a partir do citoplasma da célula.

O preparo das células nesta etapa foi iniciado com o tratamento, das células confluentes, por 24h com 267,4 μM de BTCl (previamente sonicado por 2 minutos). Procedeu-se com a desaderência das células para então, incubá-las com o *CellROX[®]* na concentração final de 5 μM por 30 minutos a 37°C. Em seguida, os tubos foram submetidas a centrifugação de 300 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado três vezes com PBS. Ademais, o pellet foi ressuscitado em 500 mL de PBS 1x para análise no citômetro de fluxo. As células controles foram aquelas não tratadas com o BTCl.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram efetuadas com o auxílio do software SPSS 19, através do Teste T e os dados foram representados como média e desvio

padrão. Os resultados e as diferenças foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,005$.

5. RESULTADOS

5.1. PURIFICAÇÃO DO BTCI

Foram logrados dois perfis de cromatograma, um obtido a partir da realização da cromatografia de troca iônica com o extrato bruto (figura 10) e outro através da (re)cromatografia de troca iônica a partir da amostra com contaminantes obtida na primeira cromatografia (figura 11).

Ao observar os cromatogramas, a porção ascendente do pico mais alto, em ambos, foi considerada como a fração com contaminantes das alíquotas coletadas, ao passo que a porção descendente continha o BTCI puro. Assim, esta foi a parcela separada para a continuação dos experimentos.

O montante purificado passou pelo processo de diálise e concentração com o AMICON da Millipore e foi posteriormente congelado, liofilizado e mantido em freezer a -20°C para utilização posterior.

5.1.1. PADRONIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DO BTCI

Tendo em vista que a técnica de purificação do BTCI era a mesma há décadas tomou-se a iniciativa de melhorá-la, parcialmente. Assim, o sistema de diálise utilizando o sistema AMICON (figura 12) foi implementado, visando o aumento do rendimento da proteína purificada e otimização do tempo de obtenção da amostra purificada. Por meio desta nova técnica foi possível coletar dez vezes mais frações de eluição da cromatografia, o que aumentou o rendimento em 6 vezes. Ademais, poupou-se:

- a. Tempo (40%), resultando na redução do tempo de purificação em menos horas;
- b. Mão de Obra, considerando-se que a diálise demandava manipulação de hora em hora, e;
- c. Recursos, todos esses itens em comparação com o método anterior.

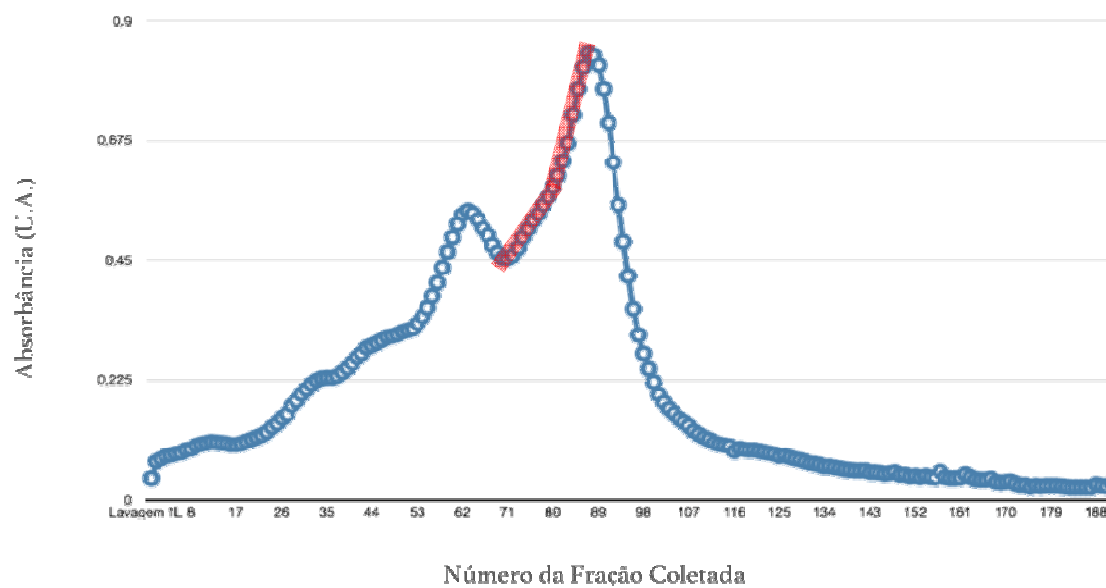


Figura 10: Cromatograma obtido a partir do extrato bruto de *Vigna unguiculata*. As amostras eluídas foram monitoradas por leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Destacado em vermelho está a fração utilizada para a recromatografia.

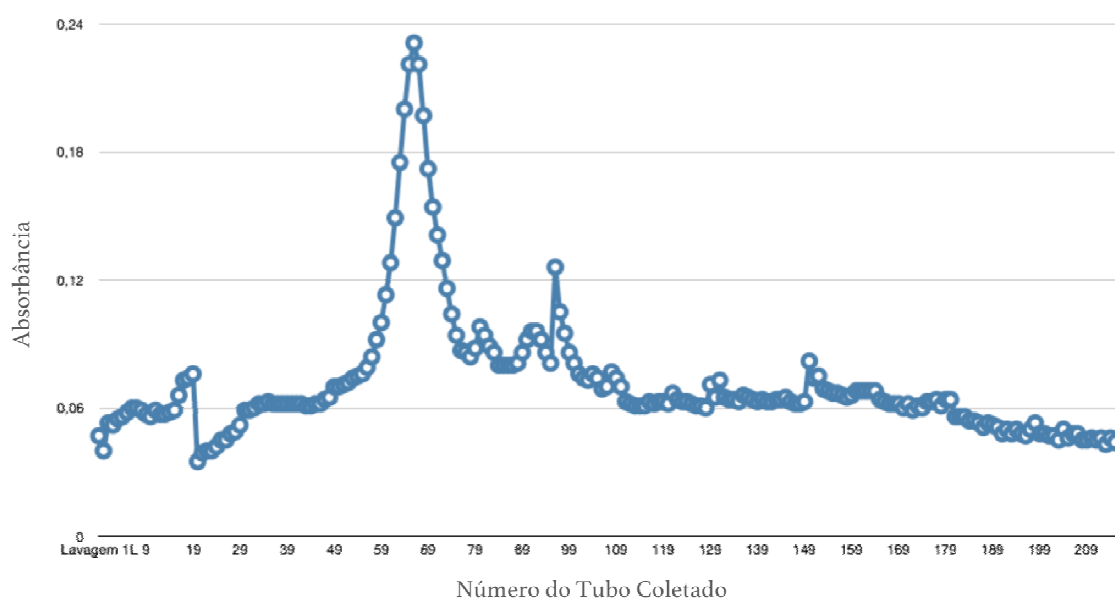


Figura 11: Recromatograma obtido a partir das amostras pré-fractionadas de BTCl (figura 10). As amostras eluídas foram monitoradas por leitura em espectrofotômetro a 280 nm.

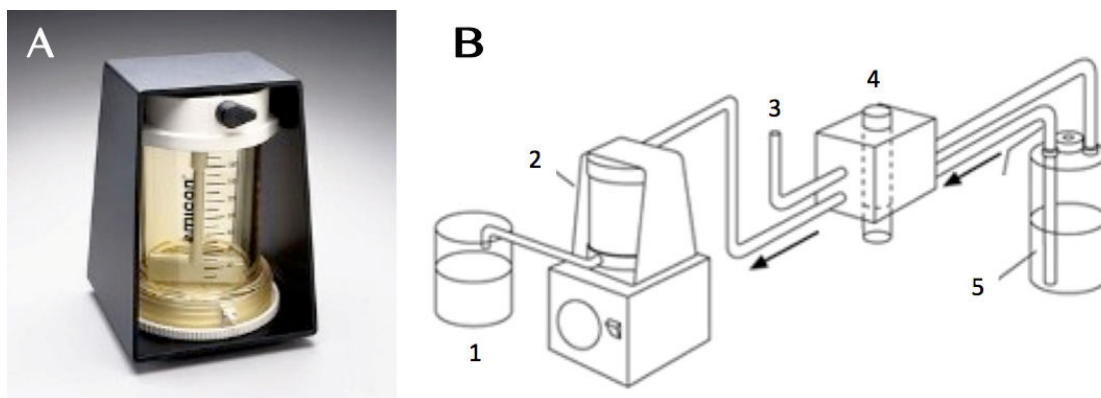


Figura 12: Sistema de ultrafiltração Amicon® da Millipore. No lado B da figura observam-se os componentes necessários para o funcionamento do sistema: ¹descarte; ²sistema Amicon; ³câmulas; ⁴manômetro; ⁵cilindro com gás nitrogênio. Imagens adaptadas de: <<https://www.merckmillipore.com/BR/pt/life-science-research/protein-sample-preparation/protein-concentration/large-volumes-samples/amicon-stirred-cells/tYyb.qB.CPEAAAFBxwtlvxyv,nav>> e <<http://pt.medwow.com/med/water-purification-system/millipore/amicon-8050/57641.model-spec>>.

5.1.2. GRAU DE PUREZA DO BTCI AVALIADO POR MALDI-TOF

Após a diálise e concentração das frações obtidas da cromatografia de troca iônica o grau de pureza das alíquotas foi avaliado. Na figura 13 é apresentado o espectro obtido por meio de espectrometria de massa, onde é possível observar a existência de dois picos com razão massa carga (m/z) distintos. O pico equivalente ao BTCI apresenta a m/z 9115, ao passo que o de m/z 4555 equivale a uma dupla carga da mesma molécula, por isso apresenta - aproximadamente - metade do valor. O espectro abaixo revela um grau de pureza de 100%.

5.2. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR - MTT

O ensaio colorimétrico de formazan, produzido a partir de MTT, mostrou que a redução na viabilidade das células MDA-MB-231, na presença de BTCI por 24h, foi dose dependente. O IC_{50} foi obtido a partir da curva de viabilidade celular ajustada segundo método não linear (decaimento exponencial), cujo valor foi 267,4 μ M de BTCI (figura 14), este valor foi semelhante ao obtido em outras pesquisas utilizando o mesmo inibidor em diferentes linhagens de câncer.

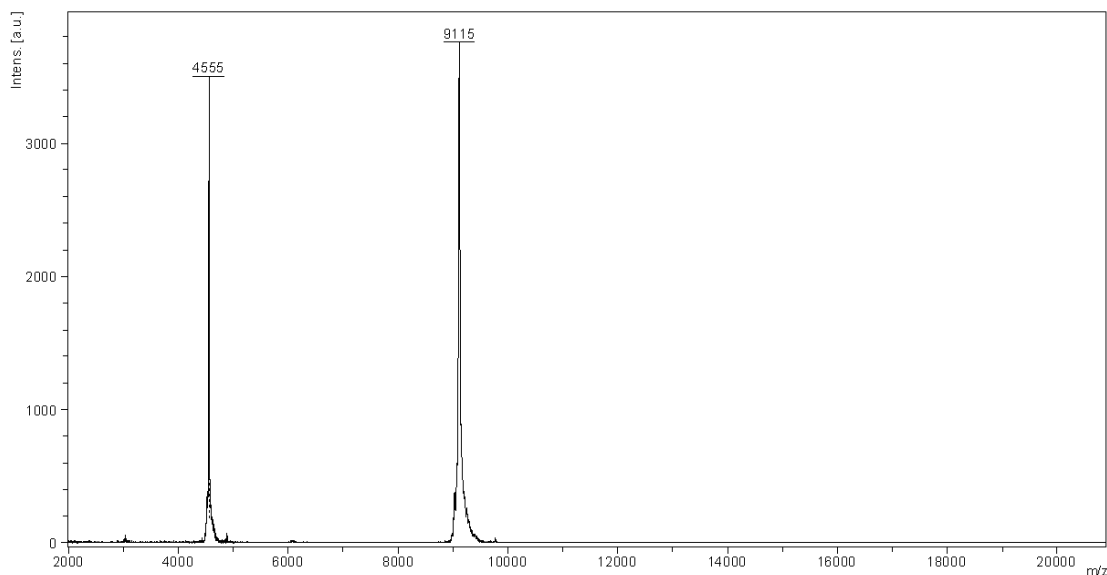


Figura 13: Espectro de massa do BTCI obtido por recromatografia de troca iônica. A massa molecular e pureza do BTCI são mostradas, com um único pico de ~9,1 kDa (SILVA *et al.*, 2005; ESTEVES *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2014; ÁLVARES *et al.*, 2014) e o menor pico equivalendo a sua dupla carga ($[M+2H]^+$).

5.2.1. PADRONIZAÇÃO DO TRATAMENTO COM BTCI

Tendo em vista que a filtração da amostra de BTCI purificado, em membrana MILIPORE de 0,22 μ m, alterava a concentração previamente determinada do inibidor, não foi possível estabelecer um padrão para reajustar a concentração desse inibidor. Por esse motivo, optou-se por não utilizar BTCI estéril nos ensaios *in vitro* subsequentes.

Entretanto, outra dificuldade foi constatada. Após a incubação do BTCI com as células foi verificado, por microscópio de luz invertido, que, na maioria das vezes, a suspensão apresentava alto grau de agregação. Receando que esta tendência à formação de agregados viesse a atrapalhar a interação do inibidor com as células estudadas optou-se por sonicar (por 2 minutos) a alíquota de BTCI, antes de proceder com os ensaios *in vitro* com as células de adenocarcinoma mamário.

O ajuste não linear, com decaimento exponencial, da curva de viabilidade celular (Figura 14), utilizando o programa Origin, resultou no valor de IC_{50} de 267,4 μ M. Esse mesmo resultado está apresentado em um gráfico de barras, apresentado na figura 15. O cálculo também foi feito utilizando o Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A determinação da concentração do IC_{50} (figuras 14 e 15) foi essencial para os experimentos subsequentes.

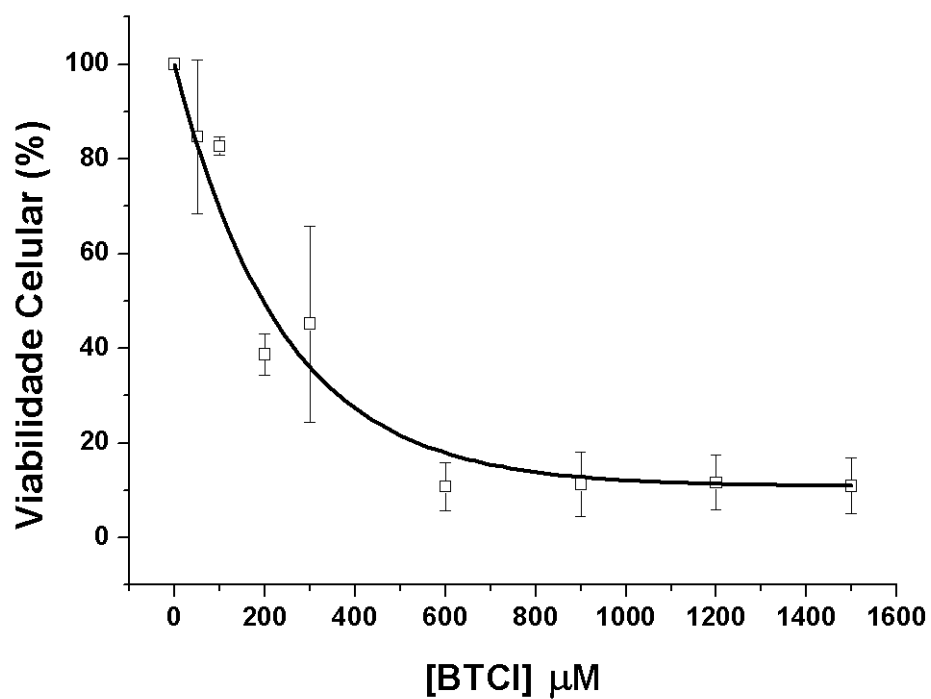


Figura 14: Curva de viabilidade celular ajustada das células MDA-MB-231, na presença do BTCI. O BTCI, na concentração de 267,4 μM por 24h.

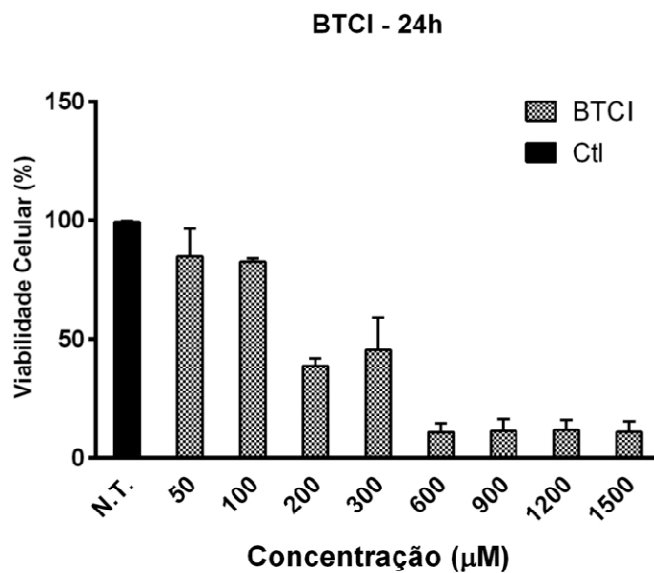


Figura 15: Gráfico de barras da viabilidade celular das células MDA-MB-231. O BTCI na concentração de 267,4 μM por 24h, sendo $p < 0,005$.

5.3. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MECANISMOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Nos ensaios de citometria de fluxo foram utilizadas células MDA-MB-231 tratadas com 267,4 μ M de BTCI por 24 h. Os dados foram coletados em triplicata e os resultados apresentados representam a média das três leituras realizadas pelo citômetro de fluxo. As populações celulares e suas diferentes respostas de intensidade de fluorescência foram obtidas para cada amostra estudada e estão apresentadas a seguir.

5.3.1. ANÁLISE DE CICLO CELULAR

Ao analisar os histogramas ilustrativos do ciclo celular observou-se uma redução na proporção de células em G1 e aumento das células em G2, indicando uma parada das células nesta fase, assim como ocorreu em estudos anteriores com MCF7.

Na figura 16 pode ser observado que o grupo de células MDA-MB-231 não tratadas com BTCI tiveram maior intensidade de sinal que as tratadas, ao passo que o perfil do histograma se manteve semelhante nas células com BTCI (figura 17), porém, com menor intensidade de sinal (tabela 3) e maior quantidade de debris celulares, que refletem o efeito terapêutico - indireto - que este inibidor tem sobre a fragmentação do DNA de células cancerígenas.

Portanto, há evidência do efeito citostático e confirmação do efeito citotóxico pois, na figura 15 percebe-se o aumento do montante de células em fase G2, o que caracteriza o efeito citostático exercido pelo BTCI sobre esta linhagem celular. Além disso, também é evidente a sobreposição (figura 16B) de fases do ciclo (G_0/G_1 e S, assim como S com G_2/M).

Tabela 3: Estudo comparativo do ciclo celular entre as populações tratadas - com 267,4 μ M de BTCI por 24h - e não tratadas. Análise feita com as células viáveis.

Fases	Grupos	Controle	Tratado
G0/G1		50,7%	18,6%
S		19,2%	7,8%
G2/M		11,8%	7,8%
Ponderações		Caracterização de Efeito Citostático	

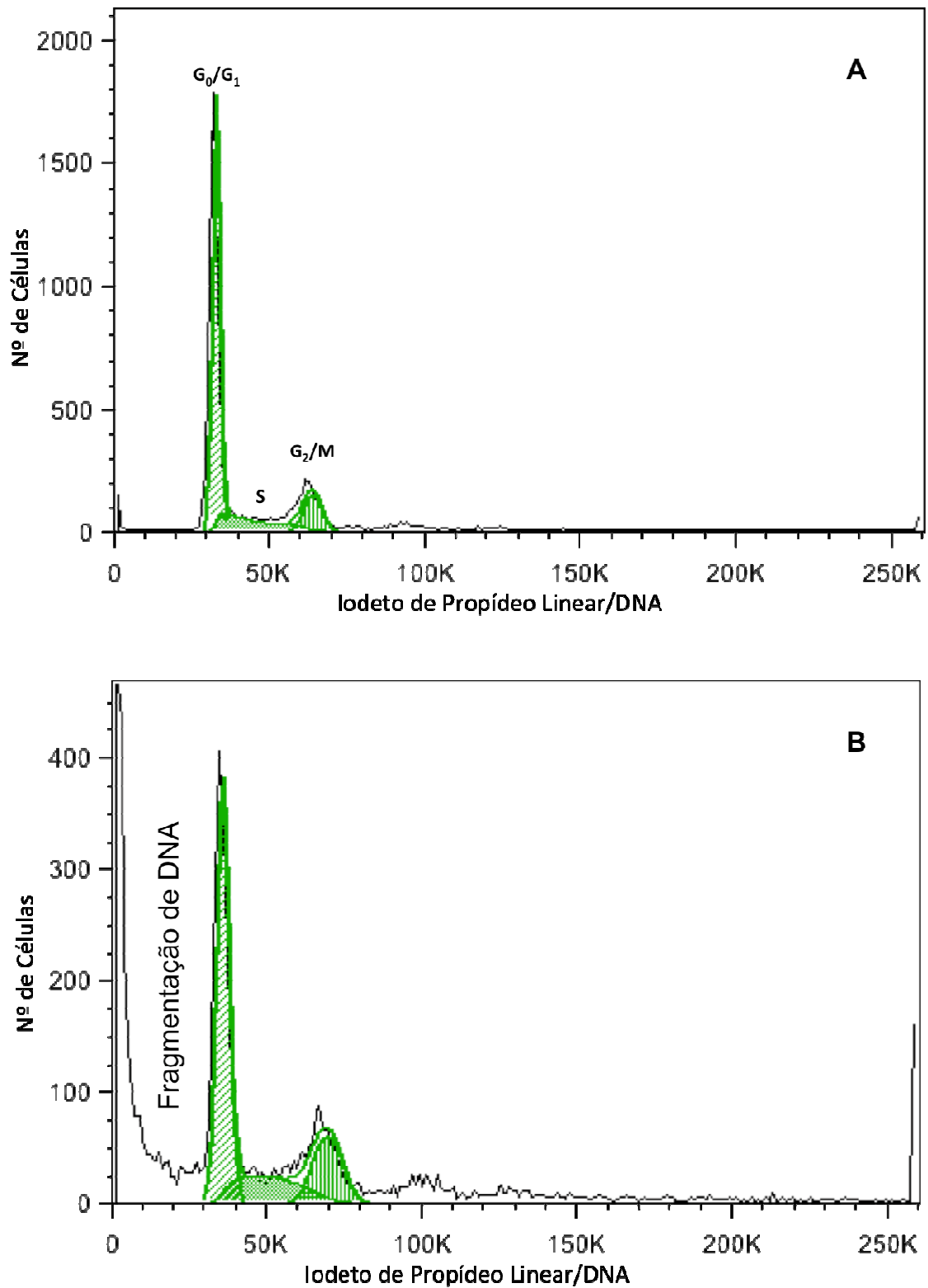


Figura 16: Histogramas de ciclo celular, onde as médias calculadas foram: A) 50,7% das células encontravam-se em G1; 19,2% em fase S; e 11,8% em G2; B) 18,6% das células encontravam-se em G1; 7,8% em fase S; e 7,8% em G2.

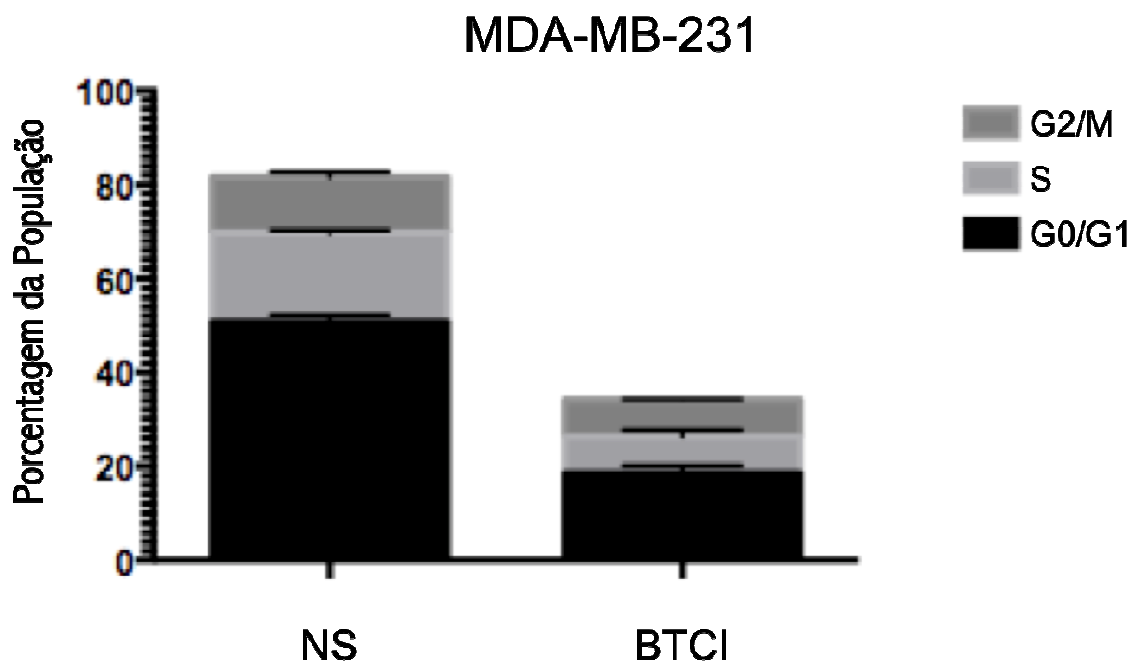


Figura 17: A análise estatística do PI Ciclo Celular demonstrou que o BTCl aumentou a fração G2, caracterizando um efeito citostático sobre as células da linhagem MDA-MB-231 em comparação com o grupo não tratado (NS).

5.3.2. VIA DE MORTE CELULAR

Os resultados a seguir correspondem às porcentagens de células viáveis, apoptóticas e/ou necróticas estudadas. A análise da via morte (apoptose, apoptose tardia e necrose) das células em questão foi realizada por meio da constatação da exposição da fosfatidilserina e da perda de integridade da membrana celular. Esta análise foi possível por meio da marcação do fosfolipídio externalizado com fluoresceína (anexina V-FITC) e iodeto de propídio (PI).

Assim, na figura 18 (A-E), apresentamos *dot plots* da linhagem de células MDA-MB-231 contendo: A) população não marcada; B) controle positivo do hit para PI, ou seja, população células que sofreram morte por necrose; C) controle positivo do kit para anexina V-FITC, ou seja, células mortas por apoptose; D) controle de células normais; E) grupo de células tratadas com BTCl na concentração de 267,4 μ M durante 24 h.

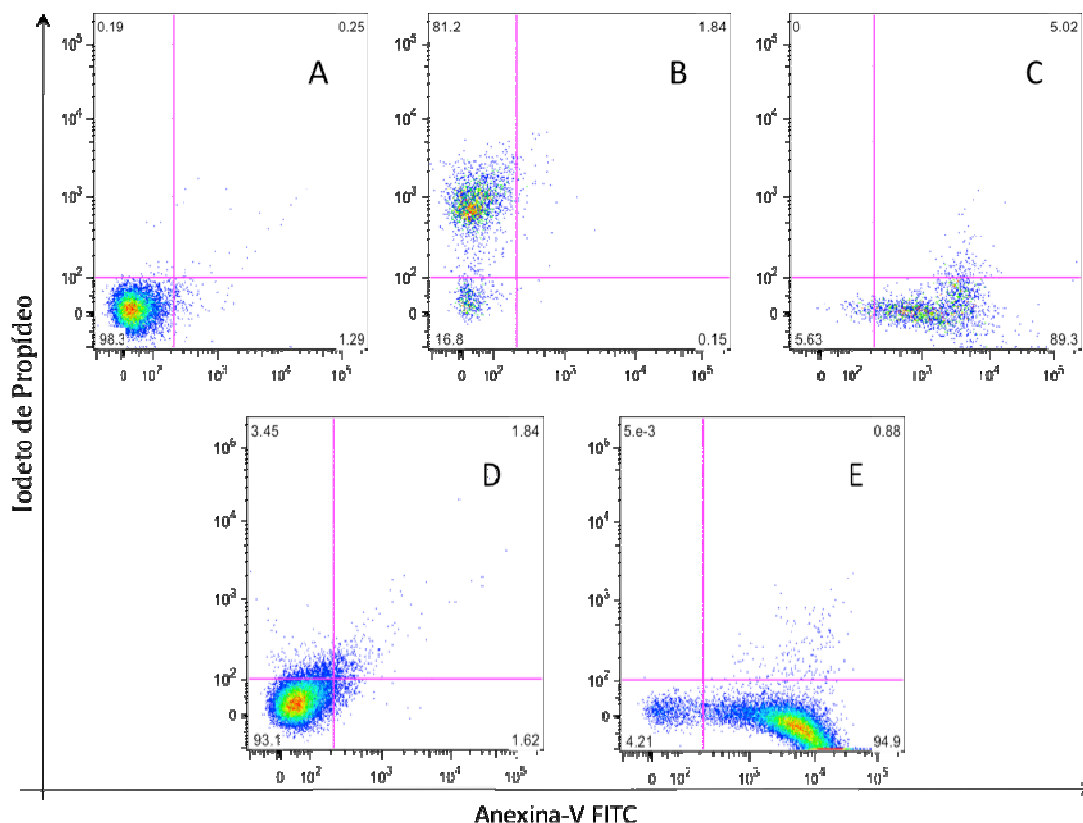


Figura 18: Análise da via de morte celular. A) Células MDA-MB-231 viáveis, não tratadas com BTCI; B) Células MDA-MB-231 submetidas a inativação, marcadas com PI, controle do kit; C) Células MDA-MB-231 submetidas a inativação, marcadas apenas com Anexina-V, controle do kit; D) Células controle de MDA-MB-231, não incubadas com BTCI; E) Células de MDA-MB-231 tratadas com 267,4 μ M de BTCI por 24h, morte por apoptose em 94,9% na unicata (como apresentado no *Dot Plot* ilustrativo) e média de 89,39% nas triplicatas.

As médias das porcentagens de células apoptóticas encontradas para cada grupo de estudo foram plotadas no gráfico de barras da figura 19, onde é possível observar a porcentagem de células marcadas com Anexina-V após a incubação com BTCI em contraste com as células viáveis do controle positivo, sendo $p=0,001$. Isto caracteriza a apoptose como o principal mecanismo de morte celular para as células de MDA-MB-231 tratadas com BTCI (sonicado) por 24h pois, esta foi a via de morte em ~90% dos eventos estudados.

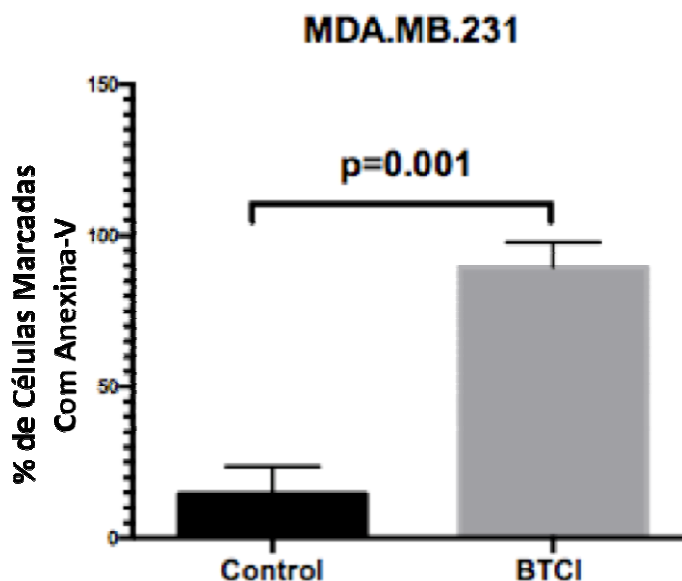


Figura 19: Análise da via de morte celular das células de MDA-MB-231 tratadas com 267,4 μM de BTCl por 24 h, e marcadas com Anexina-V.

5.3.3. ESTUDO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

A quantificação indireta da concentração citosólica de O_2^- e H_2O_2 , também foi realizada por meio da técnica de citometria de fluxo. Nas próximas figuras (20 A-C) estão os histogramas e o gráfico de barras gerados a partir da análise com sondas, no intuito de quantificar a diferença da produção de EROS entre as células tratadas com BTCl e as não tratadas.

Observou-se, com estes experimentos, que conforme demonstrado nos resultados da figura 20, a linhagem MDA-MB-231 apresenta uma mediana de intensidade de sinal EROS elevada mesmo nas células não tratadas. A resposta ao incubá-las com BTCl foi uma aleatória redução de EROS entre 30 e 90 minutos e um aumento com 24 h de tratamento.

Ao alterar o tempo de minutos para horas, observou-se que nos 30 primeiros minutos a quantidade de EROS reduziu significativamente (em comparação ao controle), aumentou sutilmente em 60 minutos e decaiu, novamente, aos 90 minutos. Isto pode indicar que o tipo de morte celular desencadeada pelo BTCl em 24h pode ser por meio da regulação da produção de EROS.

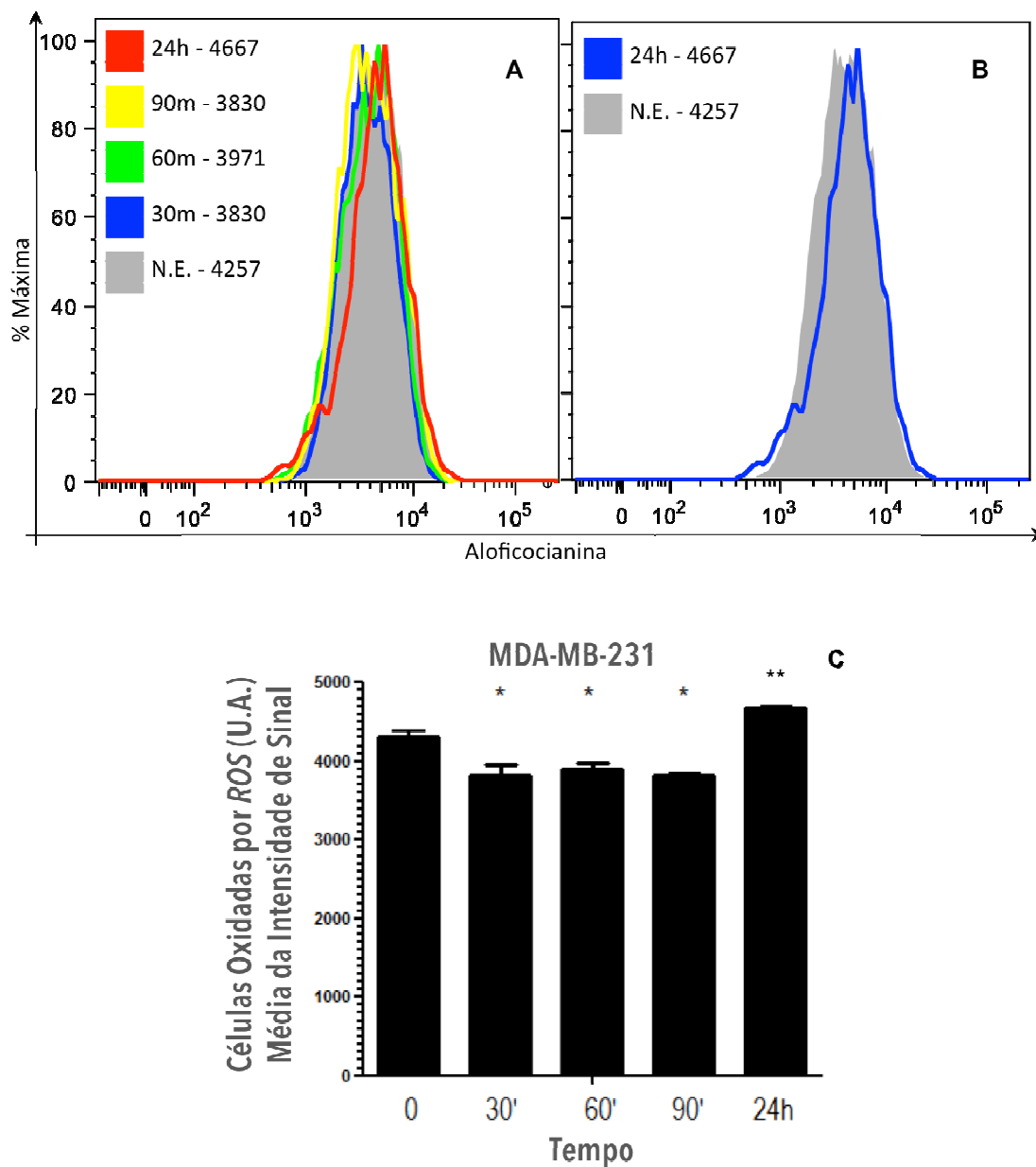


Figura 20: O efeito de 267,4 μM de BTCl na produção intracelular de EROS em células MDA-MB-231 em diferentes tempos. A) Intensidade de espécies reativas de oxigênio em células tratadas por BTCl durante 30, 60 e 90 minutos, além de 24 horas; B) Histograma comparativo da produção de EROS em células não estimuladas e tratadas por 24 horas com BTCl; C) Gráfico de barras com a média de células tratadas com BTCl em diferentes tempos - não estimulada, 30, 60, 90 minutos e 24 horas - e a respectiva produção de espécies reativas de oxigênio. * Resultado Aleatório e ** Resultado Significativo $p < 0,005$.

6. DISCUSSÃO

Os cromatogramas de purificação do BTCI, provenientes da aplicação do extrato bruto das sementes de *Vigna unguiculata*, mantiveram o mesmo perfil de estudos anteriores. Adicionalmente, os espectros da espectrometria de massa apresentando os picos correspondentes a uma e dupla cargas do inibidor de protease analisado, mostra a presença de um único composto com massa molecular de aproximadamente 9,1 kDa (OLIVEIRA, 2012; XAVIER, 2012; JOANITTI, 2012; SOUZA, 2010; VENTURA & XAVIER-FILHO, 1966), correspondente ao BTCI purificado.

Porém, diferentemente do procedimento realizado nas pesquisas anteriores, a diálise das amostras de BTCI obtidas após cromatografia de troca iônica, não foram feitas utilizando membranas de diálise e métodos convencionais, mas sim utilizando o sistema AMICON da Millipore, acoplado ao cilindro de nitrogênio gasoso. Portanto, esse novo método permitiu significativo aumento no rendimento do BTCI purificado pela cromatografia de troca iônica.

O rendimento de BTCI puro obtido por meio das técnicas de purificação era de ~30 mg por alíquota de extrato bruto utilizada. Contudo, muitos dias de trabalho eram necessários para atingir este montante. Decidiu-se então implementar alguma das etapas de purificação que facilitasse e permitisse aumento do rendimento em tempo menor de execução. Com a introdução da etapa de filtração em sistema Amicon o rendimento aumentou para ~6x mais. Não foram encontrados outros trabalhos de purificação de proteína que houvessem implementado esta técnica nessa proporção.

Por meio do teste colorimétrico de MTT, observou-se a produção inversamente proporcional de formazan em relação à dose de BTCI utilizada para tratar as células da linhagem MDA-MB-231, corroborando com outros estudos (SOUZA, 2010; JOANITTI, 2012) ao caracterizar este inibidor com efeito dose-dependente sobre outras células neoplásicas da mama.

O IC₅₀ foi determinado com tempo de 24h, visto que os ensaios subsequentes avaliariam os efeitos mais imediatos do efeito do BTCI, *in vitro* no adenocarcinoma mamário. Ensaio com células normais não foram realizados pois, já se sabia do inócuo/nulo efeito do BTCI sobre células normais da mama, da linhagem MCF10 (JOANITTI *et al.*, 2010).

Em contraste com os resultados obtidos no estudo com células neoplásicas de mama não invasivas (MCF-7), a ativação das vias de morte celular da linhagem invasiva

(MDA-MB-231) demandaram maior concentração do BTCI (267,4 μM), porém menor tempo de incubação (JOANITTI *et al.*, 2010), o que pode refletir maior vulnerabilidade por parte de linhagens com maior intensidade de proliferação. Portanto, a hipótese inicial, de que o BTCI teria efeito citotóxico e citostático também sobre uma linhagem metastática, assim como teve sobre aquela não invasiva, foi considerada e confirmada.

Entretanto, há diferenças consideráveis no IC_{50} do BTCI (200-267,4 μM) em relação a outros BBIs, revelando que, na maior parte dos casos e estudos feitos até agora, o inibidor de *Vigna unguiculata* demanda concentrações maiores para exercer efeitos citostáticos e citotóxicos. Análises de BBI de *pinto bean* realizadas por CHAN e colaboradores (2014) resultaram em um IC_{50} de 35 μM contra MCF7; estudos feitos por CLEMENTE & ARQUES (2014) com BBIs de ervilha, lentilha e soja tiveram IC_{50} variando entre 32-73 μM contra diferentes linhagens de câncer colorretal.

Contudo, a linhagem MDA-MB-231 não demandou uma concentração de BTCI muito maior do que as estudadas anteriormente. Esperava-se que os mecanismos de evasão celular (WEINBERG, 2007) fossem mais eficientes em uma linhagem metastática. Para esse tipo de análise, foi considerado que houve uma equivalência entre os resultados das duas linhagens (MCF7 e MDA-MB-231), visto que ocorre uma compensação entre tempo e quantidade do composto bioativo utilizado.

Considerando os resultados apresentados, o passo seguinte foi investigar qual o mecanismo de ação do BTCI sobre as células cancerígenas. Supostamente, ambas as linhagens citadas não apresentam algum aparato capaz de evadir ao tratamento e bloquear a(s) cascata(s) de ativação do processo de morte celular desencadeados, direta ou indiretamente, pelo BTCI.

No intuito de compreender o possível mecanismo pelo qual o inibidor de proteases BTCI afeta a viabilidade, bem como outros efeitos, das células MDA-MB-231, diferentes vias foram avaliadas, como a produção de espécies reativas de oxigênio. As células foram incubadas com a concentração de 267,4 μM de BTCI, determinada previamente por 24h e em outros tempos para monitorar alguns dos efeitos desta molécula na via citada.

Para tanto, utilizou-se a técnica multiparamétrica da citometria de fluxo com diferentes marcadores. A marcação com anexina V-FITC foi utilizada para caracterizar a exposição da fosfatidilserina, traço marcante da morte por apoptose. Ao passo que o intercalante de DNA, iodeto de propídeo, foi a sonda discriminadora para células em

apoptose tardia ou processo necrótico. Assim, as quatro populações de células foram avaliadas simultaneamente: normais, apoptóticas, apoptose tardia e necróticas.

Houve redução da viabilidade celular do grupo incubado com BTCI em comparação com o grupo não tratado. A visualização do histograma revela 89,39% das células com marcação de anexina V-FITC positiva, ou seja, cerca de 90% das células analisadas sofreram morte por apoptose. E em abono, pode-se ressaltar que a especificidade do BTCI é notavelmente alta, já que não gerou nenhum efeito colateral em células normais (MCF10) da mama (JOANITTI *et al.*, 2010).

Por meio da análise comparativa de ciclo celular entre as triplicatas tratadas e não tratadas com BTCI, observou-se uma diferença significativa na intensidade do sinal (histograma, figura 16), que é cerca de quatro vezes menor nas populações que foram tratadas com o BTCI. Houve também a evidência de quantidade de *debris*, como a fragmentação de DNA, no grupo tratado e esta fragmentação é uma característica marcante da apoptose (ZIMMERMANN *et al.*, 2001; WANG & YOULE, 2009)

O funcionamento normal do ciclo celular é regulado por ciclinas e cada fase do ciclo tem um propósito específico para o desenvolvimento do organismo. G1 é a etapa de "entrada" do ciclo celular, em que o DNA estará bem enovelado, a partir de onde a célula pode entrar em repouso G0 ou dar início ao processo de multiplicação, fase S, produzindo, inicialmente mais DNA.

Ao seguir para a fase G2 a célula aumenta seu volume e passa a produzir componentes que serão necessários na mitose, que é a próxima fase (M). Assim, a mitose é o tempo pelo qual a célula leva para completar a prófase (condensação de cromossomos com dissolução dos nucléolos e da carioteca), metáfase (encurtamento dos cromossomos e formação do fuso equatorial), anáfase (separação das cromátides irmãs duplicadas), telófase (afrouxamento dos cromossomos e reconstrução da carioteca) e a citocinese (invaginação responsável por separar a célula mãe da célula filha). Após isso, o ciclo celular recomeça (ALMEIDA *et al.*, 2005; DICKSON & SCHWARTZ, 2009).

Neste trabalho observou-se que as células tratadas com BTCI foram embargadas na fase G2, indicando efeito citostático sobre a linhagem estudada, o que corrobora com o mecanismo de intervenção, dependente da fase do ciclo celular, de diversas categorias de agentes quimioterápicos antineoplásicos (figura 21). ALMEIDA e colaboradores (2005) classificaram alguns agentes antineoplásicos que interagem com DNA como:

ciclo celular específicos ou não específicos (tabela 4). Nessa revisão produtos naturais também foram arrolados, grupo ao qual podemos incluir o inibidor de feijão de corda.

Tabela 4: Relação entre o tipo de interação com o ciclo celular e as subclasses de produtos naturais. Classificação feita por ALMEIDA e colaboradores (2005), mas editada e complementada.

Agentes ciclo-celular específicos (CCS, “Cell Cycle-Specific”)	Agentes ciclo-celular não específicos (CCNS, “Cell Cycle-NonSpecific”)
1.a. Alcalóides vegetais 1.a.1. Alcalóides da vinca 1.a.2. Podofilotoxinas (EPIPodofilotoxinas) 1.a.3. Paclitaxel (Taxol) 1.b. Enzimas 1.c. Proteínas e Peptídeos	2. Produtos Naturais 2.a. Antibióticos naturais 2.a.1. Antraciclinas 2.a.2. Mitomicina 2.a.3. Dactinomicina 2.a.4. Plicamicina 2.a.5. Bleomicina 2.b. Alcalóides pirrolizidínicos

Algumas das características destes compostos naturais foram a formação de EROS e a intervenção no ciclo celular, dois dos efeitos observados na interação entre BTCI e MDA-MB-231. Contudo, nenhum ensaio foi realizado visando a classificação do BTCI dentre as categorias estabelecidas na tabela acima.

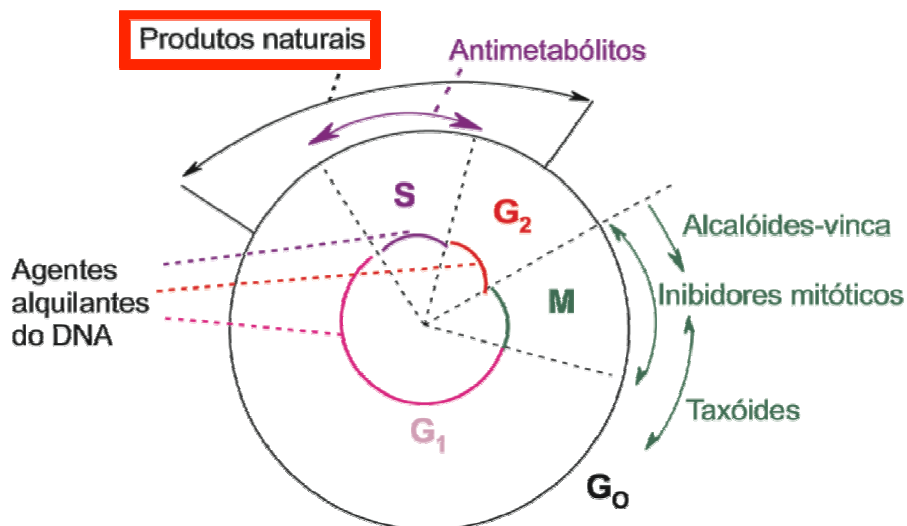


Figura 21: Ilustração do mecanismo de intervenção, dependente da fase do ciclo celular, de diversas categorias de agentes quimioterápicos antineoplásicos. Imagem adaptada a partir de ALMEIDA *et al.*, 2005.

O efeito citostático observado nas células tratadas com BTCI pode ter provocado a estagnação do ciclo celular como possível consequência da ação de *EROS* (ALMEIDA *et al.*, 2005), responsável pela regulação fisiológica de moléculas relacionadas à proliferação, diferenciação e morte celular (PARAVICINI & TOUYZ, 2006).

Contudo, a superexpressão das espécies reativas de oxigênio, como demonstrado na figura 20, não resultou unicamente em estagnação do ciclo, como também em citotoxicidade. Com as pesquisas e ensaios realizados ao longo desta dissertação pode-se afirmar que um dos mecanismos utilizados pelo BTCI para regular o ciclo celular (tabela 3) é a acentuada produção de *EROS*, pela qual também induz a morte celular por apoptose (JOANITTI *et al.*, 2010).

Quanto à comparação da produção de *EROS*, observou-se que mesmo o grupo controle de células neoplásicas apresentou um percentual elevado. Contudo, foi ainda maior a produção das espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com BTCI por 24h, evidenciando o efeito estimulador/regulador do inibidor sobre este mecanismo.

7. CONCLUSÕES

- Com a implementação do sistema de diálise e concentração AMICON foi possível melhorar o rendimento da purificação do BTCI em 6x.
- Aprimorou-se também a técnica de tratamento *in vitro* com o BTCI por meio da sonicação do inibidor antes de incubá-lo com as células, evitando assim a agregação da molécula.
- A concentração de BTCI capaz de reduzir a viabilidade de 50% (IC₅₀) da linhagem de células estudadas neste trabalho (MDA-MB-231) foi de 267,4 µM durante 24 h.
- Houve efeito citotóxico e citostático em 24h de incubação com o BTCI.
- Quanto à modulação do ciclo celular, observou-se que o BTCI interferiu no ciclo da linhagem em questão, caracterizando seu efeito citostático pelo aumento do número de células na fase G2.
- Por meio de ensaios referentes a viabilidade, utilizando citometria de fluxo observou-se, com a marcação de PI e anexina V-FITC, que uma média de 89,39% das células sofreram morte por apoptose.
- A análise de estresse oxidativo mostrou aumento da produção de EROS nas células incubadas com BTCI. Sabendo que as EROS desempenham papel importante na ativação de mecanismos indutores de apoptose, os resultados apresentados sugerem que o processo apoptótico aqui estudado foi deflagrado por EROS.
- Portanto, os resultados desta pesquisa indicam efeitos citostáticos e citotóxicos do inibidor de serinoproteases *black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor* no adenocarcinoma mamário da linhagem MDA-MB-231.
- O BTCI pode ser considerado como um agente terapêutico adjuvante em potencial até mesmo para câncers de mama invasivos/metastáticos.

8. PERSPECTIVAS

- Classificar se o BTCI é um agente antineoplásico que interage com o DNA, conforme a tabela 4 e se é: ciclo celular específico ou não específico.
- Analisar se o BTCI teria um efeito regulador semelhante ao BBI, ou seja, se este inibidor atuaria direta ou indiretamente, sobre inibidores de ciclo e ciclinas.
- Verificar se o efeito antioxidante observado nos tempos de 30, 60 e 90 minutos (figura 20) revela que a ação do BTCI é tempo dependente. Ou se as células cancerígenas desta linhagem possuem a habilidade de combater os efeitos de radicais livres em curtos períodos de tempo.
- Desenvolver estudos de sinalização celular precisam para elucidar quais são, além do proteassoma (SOUZA, 2010), as interações realizadas pelo BTCI no espaço intra e extracelular que possibilitam o desencadeamento da morte celular, assim como a estagnação do ciclo de vida da célula.
- Estudar em meios de cultura 2D e 3D se o BTCI interfere na migração de células invasivas, posto que para movimentarem-se tais células precisam degradar a matriz extracelular com proteases.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B.B.; ICHIKAWA, H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. **Cell Cycle**, pp. 1201-1215; 2005.
- ALLEN, N.E.; APPLEBY, P.N.; DAVEY, G.K.; KAAKS, R.; RINALDI, S.; KEY, T.J. The associations of diet with serum insulin-like growth factor I and its main binding proteins in 292 women meat-eaters, vegetarians, and vegans. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, pp. 1441-1448; 2002.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, pp. 118-129; 2005.
- ÁLVARES, A.C.M.; SCHWARTZ, E.F.; AMARAL, N.O.; TRINDADE, N.R.; PEDRINO, G.R.; SILVA, L.P.; FREITAS, S.M. Bowman-Birk Protease Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds Enhances the Action of Bradykinin-Related Peptides. **Molecules**, pp. 17536-17558; 2014.
- AmiGO - THE GENE ONTOLOGY. Acesso em 23 de maio de 2014. Disponível em: <<http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0005109>>.
- ATCC¹. Acesso em: 23 de maio de 2014. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/HTB-26D.aspx#generalinformation>>.
- ATCC². Acesso em: 23 de maio de 2014. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx#characteristics>>.
- BALDWIN, W.S.; LEBLANC, G.A. The anti-carcinogenic plant compound indole-3-carbinol differentially modulates P450-mediated steroid hydroxylase activities in mice. **Chem Biol Interact**, pp. 155-169; 1992.
- BARBOSA, J.A.R.G.; SILVA, L.P.; TELES, R.C.L.; ESTEVES, G.F.; AZEVEDO, R.B.; VENTURA, M.M.; FREITAS, S.M. Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with b-Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases. **Biophysical Journal**, pp. 1638-1650; 2007.
- BAUMAN, S.J.; WHINNA, H.C.; CHURCH, F.C. Serpins (serine protease inhibitors). **Curr Protoc Protein Sci**, 14 pp.; 2002.
- BD BIOSCIENCES - FACS Verse Flow Cytometer Technical Specifications. Acesso em: 02 de março de 2015. Disponível em: <https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_TechSpecs.pdf>.
- BD BIOSCIENCES - Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Acesso em: 02 de março de 2015. Disponível em: <<http://www.d.umn.edu/~biomed/flowcytometry/introflowcytometry.pdf>>.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, pp. 245-313; 2007.
- BELL, M.C.; CROWLEY-NOWICK, P.; BRADLOW, H.L.; SEPKOVIC, D.W.; SCHMIDT-GRIMMINGER, D.; HOWELL, P.; MAYEAUX, E.J.; TUCKER, A.; TURBAT-HERRERA, E.A.; MATHIS, J.M. Placebo-controlled trial of indole-3-carbinol in the treatment of CIN. **Gynecol Oncol**, pp. 123-129; 2000.
- BENNET, M.R.; GIBSON, D.F.; SCHWARTZ, S.M.; TAIT, J.F. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. **Circ Res**, pp. 1136-1142; 1995.
- BERTHO, A.L. Citometria de Fluxo. Acesso em: 15 de maio de 2014. Disponível em: <<http://tecinmed.com/artigos/fisbioqui/4-citometros-de-fluxo-fluorocromos.pdf>>.
- BIOSYSTEMS. Acesso em: 23 de maio de 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/198789?Sel=geneid:7477#show=genes>>.
- BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor: Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **Int J Pept Protein Res.**, pp. 113-131; 1985.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **Eur J Biochem**, pp. 433-451; 1992.

- BRADLOW, H.L.; MICHNOVICZ, J.J.; TELANG, N.T.; OSBORNE, M.P. Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. **Carcinogenesis**, pp. 1571-1574; 1991.
- BUDIARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, pp. 269-290; 1999.
- CAMPAGNARO, B. P. **Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos**. Tese de Doutorado - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.
- CARVALHO, A.F.; SANTOS-NETO, M.S.; MONTEIRO, H.S.A.; FREITAS, S.M.; MORHY, L.; NASCIMENTO, N.R.F.; FONTELES, M.C. BTCI enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. **Braz. J. Biol.**, pp. 157-162; 2008.
- CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: par tone - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 23 pp.; 2004.
- CHIELA, E.C.F. **A autofagia e o ciclo celular desempenham papel central no mecanismo de ação do resveratrol e do co-tratamento com temozolomida em células de linhagens de glioblastoma humano**. Dissertação de Mestrado - Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
- CLEMENTE, A.; ARQUES, M.C. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. **World J Gastroenterol**, pp. 10305-10315; 2014.
- COSTA, H.; SOLLA, J.; TEMPORÃO, J.G. **Controle do Câncer de Mama: Documento de Consenso - Criação, Redação e Distribuição**. Instituto Nacional de Câncer (INCA) e Coordenação de Prevenção e Vigilância (CONPREV), Ministério da Saúde; 2004.
- CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.J.; SILVA, M.T.; LEÃO, C. Contribuições da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Bol Biotec**, pp. 19-33; 2002.
- DERYUGINA, E.I.; SOROCEANU, L.; STRONGIN, A.Y. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human gliomaxenograft growth and angiogenesis. **Cancer Research**, pp. 580-588; 2002.
- DESANTIS, C.E.; LIN, C.C.; MARIOTTO, A.B.; SIEGEL, R.L.; STEIN, K.D.; KRAMER, J.L.; ALTERI, R.; ROBBINS, A.S.; JEMAL, A. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. **CA CANCER J CLIN**, pp. 252-271; 2014.
- DICKSON, M.A.; SCHWARTZ, G.K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Oncology**, pp. 36-43; 2009.
- EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Revista Brasileira de Cancerologia, Brasil. Acesso em: 22 de maio de 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_46/v01/artigo4.html>.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, pp. 495-516; 2007.
- ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, pp. 43-50; 1998.
- ESTEVEZ, G.F.; TELES, R.C.L.; CAVALCANTE, N.S.; NEVES, D.; VENTURA, M.M.; BARBOSA, J.A.R.G.; FREITAS, S.M. Crystallization, data collection and processing of the chymotrypsin-BTCI-trypsin ternary complex. **Acta Cryst.**, pp. 1087-1090; 2007.
- ESTEVANATO, L.L.C.; SILVA, J.R.; FALQUEIRO, A.M.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A.C.; MORAIS, P.C.; LACAVA, Z.G.M. Conanoencapsulation of magnetic nanoparticles and selol for breast tumor treatment: in vitro evaluation of cytotoxicity and magnetohyperthermia efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, pp. 5287-5299; 2012.
- FEREIDUNIAN, A.; SADEGHALVAD, M.; OSOIE, M.O.; MOSTAFAIE, A. Soybean Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI): Identification of the Mechanisms of BBI

- Suppressive Effect on Growth of Two Adenocarcinoma Cell Lines: AGS and HT29. **Archives of Medical Research**, pp. 455-461; 2014.
- FREITAS, S.M.; IKEMOTO, H.; VENTURA, M.M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCl). **Journal of Protein Chemistry**, pp. 307-313; 1999.
- FREITAS, S.M.; MELLO, L.V.; SILVA, M.C.M.; VRIEND, G.; NESHICH, G.; VENTURA, M.M. Analysis of the black-eyed peatrypsin and chymotrypsin inhibitor- α -chymotrypsin complex. **FEBS Letters**, pp. 121-128; 1997.
- FULDA, S. & DEBATIN K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, pp. 4798-4811; 2006.
- FURLAN, D.; CERUTTI, R.; GENASETTI, A.; PELOSI, G.; UCCELLA, S.; LA ROSA, S.; CAPELLA, C. Microallelotyping defines the monoclonal or the polyclonal origin of mixed and collision endocrine-exocrine tumors of the gut. **Lab Invest**, pp. 963-971; 2003.
- GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell Death and Differentiation. **Nature Publishing Group**, pp. 1237-1266; 2007.
- GORCZYCA, W.; BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, R.J.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyltransferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. **Int. J. Oncol.**, pp. 639-648; 1992.
- GREEN DR. Apoptosis and sphingomyelin: the flip side. **J Cell Biol**, pp. 5-8; 2000.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose - Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, pp. 335-343.
- GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. Springer Verlag, 518 p.; 2004.
- HAMAJIMA, N.; HIROSE, K.; TAJIMA, K.; *et al.* Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58515 women with breast cancer and 95067 women without the disease. **Br J Cancer.**, pp. 1234-1245; 2002.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer Cell. **Cell Press**, pp. 57-70, 2000.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, pp. 770-776; 2000.
- HSIEH, C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; JEONG, H.J.; PARK, J.H.; LUMEN, B.O. Complementary Roles in Cancer Prevention: Protease Inhibitor Makes the Cancer Preventive Peptide Lunasin Bioavailable. **PLoS ONE**, 9 p.; 2010.
- HUNOT, S.; FLAVELL, R.A. Apoptosis: death of a monopoly? **Science**, pp. 865-866; 2001.
- INCA¹, Instituto Nacional de Câncer. Acesso em: 16 de dezembro de 2013. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>.
- INCA², Instituto Nacional de Câncer. Acesso em: 06 de junho de 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>>.
- INCA³, Instituto Nacional de Câncer. Acesso em: 29 de dezembro de 2013. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>.JAATTELA, M.; TSCHOPP, J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. **Nat Immunol**, pp. 416-423; 2003.
- INCA⁴, Instituto Nacional de Câncer. Acesso em: 12 de março de 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tbregioes_consolidado.asp>.
- JOANITTI, G.A.; FREITAS, S.M.; AZEVEDO, R.B. Efeitos citostáticos e citotóxicos do inibidor de proteases – BTCl – e peptídeos derivados em células de câncer de mama (MCF-7). Brasília, Distrito Federal: Universidade de Brasília, 2008.
- JOANITTI, G.A.; FREITAS, S.M.; AZEVEDO, R.B. Legume-Derived Bioactive Compounds for the Prevention and Treatment of Breast Cancer, Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities, **InTech**, pp. 319-345; 2011
- JOANITTI. Efeitos de extrato bruto de sementes de *Vigna unguiculata* e do inibidor de proteases BTCl, encapsulado em nanopartículas, no tratamento preventivo e terapêutico de câncer de mama e de pele, in vitro e in vivo. Brasília, 2012.

- JOANITTI, G.A.; AZEVEDO, R.B.; FREITAS, S.M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Letters**, pp. 73–81; 2010.
- JOANITTI, G.A.; FREITAS, S.M.; SILVA, L.P. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. **Current Enzyme Inhibition**, pp. 199-217; 2006.
- JOZA, N.; KROEMER, G.; PENNINGER, J.M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. **Trends Genet**, pp.142-149; 2002.
- KALIKS, R. Câncer de Mama. Acesso em: 06 de junho de 2014. Disponível em: <<http://www.cancerdamama.com>>.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, pp. 239-257; 1972.
- KENNEDY, A.R. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, pp. 167-209; 1998.
- KEY, T.J.; ALLEN, N.E.; SPENCER, E.A.; TRAVIS, R.C. Nutrition and breast cancer. **Breast**, pp. 412-416; 2003.
- KOBAYASHI, H. Prevention of cancer and inflammation by soybean protease inhibitors. **Frontiers in Bioscience**, pp. 966-973; 2013
- KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **J Cell Biol**, pp.188-193; 1975.
- KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nat Med**, pp. 513-516; 2000.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol Rev**, pp. 99-163; 2007.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, pp. 3–11; 2009.
- KRONE, C.A.; ELY, J.T. Controlling hyperglycemia as an adjunct to cancer therapy. **Integr Cancer Ther**, pp. 25-31; 2005.
- KUWANA, T.; NEWMAYER, D.D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Curr Opin Cell Biol**, pp. 691-699; 2003.
- LESLIE, G. Flow Cytometry: A Basic Guide. Institute of Medical Biology, University of Southern Denmark, 35 p.; 2006.
- LIMA, A.A.S.; FRANÇA, B.H.S.; IGNÁCIO, S.A.; BAIONI, C.S. Conhecimento de alunos universitários sobre câncer bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, pp. 283-288; 2005.
- LIN, L.L.; MICK, R.; WARE, J.; METZ, J.; LUSTIG, R.; VAPIWALA, N.; RENGAN, R.; KENNEDY, A.R. Phase I randomized double-blind placebo-controlled single-dose safety studies of Bowman-Birk inhibitor concentrate. **Oncology Letters**, pp. 1151-1158; 2014.
- LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp Cellular Res**, pp. 19-26; 2000.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; MATRISIAN, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, pp. 800-808; 2007.
- MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**, pp. 595-603; 1999.
- MBC Alliance. Metastatic Breast Cancer Landscape Analysis: Research Report. 132 p., 2014.
- MCBRIDE, J.D.; LEATHERBARROW, R.J. Synthetic Peptide Mimics of the Bowman-Birk Inhibitor Protein. **Current Medicinal Chemistry**, pp. 909-917; 2001.
- MEIRA, A.S. Estudo do potencial citotóxico de novos ésteres sintéticos derivados da mistura triterpenoídica α - β -amirina em modelos experimentais *in vitro*. Fortaleza-CE, 2011.
- MEMARIAN, A.; HOJJAT-FARSANGI, M.; ASGARIAN-OMRAN, H.; YOUNESI, V.; JEDDI-TEHRANI, M.; SHARIFIAN, R.A.; KHOSHNOODI, J.; RAZAVI, S.M.; RABBANI, H.; SHOKRI, F. Variation in WNT genes expression in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma**, pp. 2061-2070; 2009.

- MIORELLI, S.T. Efeitos biológicos do composto organoselenado Ebselen em células eucarióticas. ULBRA, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, pp. 55-63; 1983.
- NEUMANN, L.; PFORR, C.; BEAUDOUIN, J.; PAPPAS, A.; FRICKER, N.; KRAMMER, P.H.; LAVRIK, I.N.; EILS, R. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. **Mol Syst Biol**, pp. 352-359; 2010.
- OLIVEIRA, S.A. Síntese e Caracterização de Sistemas Nanoestruturados Contendo o inibidor de proteinases BTCI e Peptídeos Derivados. Dissertação, 2012.
- OMS¹, Organização Mundial de Saúde. **Library Cataloguing-in-Publication Data**. PRÜSS-ÜSTÜN; CORVALÁN. Preventing disease through healthy environments: Towards an estimate of the environmental burden of disease. França, 2006. ISBN 92 4 159382 2. p. 45. Disponível em: <http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/preventingdisease5.pdf>. Acesso em: 10 de dezembro de 2013.
- OMS², Organização Mundial de Saúde. Cancer Fact sheet N°297. Updated February 2014. Acesso em: 06 de junho de 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>.
- OMS³, Organização Mundial de Saúde. Raising awareness about breast cancer. Podcast, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/multimedia/podcasts/2009/breast_cancer_20091030/en/>. Acesso em: 10 de dezembro de 2013.
- OMS⁴, Organização Mundial de Saúde. World Cancer Day 2014. Acesso em: 06 de junho de 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>.
- OMS⁵, Organização Mundial de Saúde. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Acesso em: 06 de junho de 2014. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/pie_site_sel.aspx>.
- ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**, pp. 552-565; 2003.
- OVERALL, C.M.; DEAN, R.A. Degradomics: Systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, pp. 69-75; 2006.
- PACHER, M.; SEEWALD, M.J.; MIKULA, M.; OEHLER, S.; MOGG, M.; VINATZER, U.; EGER, A.; SCHWEIFER, N.; VARECKA, R.; SOMMERGRUBER, W.; MIKULITS, W.; SCHREIBER, M. Impact of constitutive IGF1/IGF2 stimulation on the transcriptional program of human breast cancer cells. **Carcinogenesis**, pp. 49-59; 2007.
- PAGANI, O.; SENKUS, E.; WOOD, W.; COLLEONI, M.; CUFER, T.; KYRIAKIDES, S.; COSTA, A.; WINER, E.P.; CARDOSO, F. International Guidelines for Management of Metastatic Breast Cancer: Can Metastatic Breast Cancer Be Cured? **J Natl Cancer Inst**, pp. 456-463; 2010.
- PARAOLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose como um mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq Gastroenterol**, pp. 138-144; 2001.
- PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. Redox signaling in hypertension. **Cardiovasc Res**, pp. 247-258; 2006.
- PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochem Biophys Acta**, pp. 83-94; 2004.
- PRENTICE, R.L.; CAAN, B.; CHLEBOWSKI, R.T. *et al.* Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. **JAMA**, pp. 629-642; 2006.
- QI, R.; SONG, Z.; CHI, C. Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Protease Inhibitors and Their Potential Application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, pp. 283-292; 2005.
- RAMALHO, L.G.; SASAKI, S.D. Estudo Sobre Inibidores de Serinoproteases Extraídos de Artrópodes. Acesso em: 04 de julho de 2014. Disponível em: <http://ic.ufabc.edu.br/II_SIC_UFABC/resumos/paper_5_214.pdf>.

- RIBEIRO, C.; SANTORO, M.M.; NESHICH, G. Análise de Padrões de Interação entre Serino Proteases e seus Inibidores Protéicos. Acesso em 09 de julho de 2014. Disponível em: <<http://www.pgbioinfo.icb.ufmg.br/defesas/10D.PDF>>. 2009.
- RICHARDS, J.A.; PETREL, T.A.; BRUEGGEMEIER, R.W. Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, pp. 203-212; 2002.
- ROCK, C.L.; BYERS, T.E.; COLDITZ, G.A.; DEMARK-WAHNEFRIED, W.D.; GANZ, P.A.E.; WOLIN, K.Y.C.; ELIAS, A.B.; KRONTIRAS, H.D.; LIU, J.C.; NAUGHTON, M.C.; PAKIZ, B.A.; PARKER, B.A.A.; SEDJO, R.L.B.; WYATT, H.B. Reducing breast cancer recurrence with weight loss, a vanguard trial: The Exercise and Nutrition to Enhance Recovery and Good Health for You (ENERGY) Trial. **Contemporary Clinical Trials**, pp. 282–295; 2013.
- SAAVEDRA, P.H.V. O papel do inflamassoma na infecção induzida pelo *Cryptococcus neoformans*. Brasília-DF, 2013. Acesso em: 30 de janeiro de 2015. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13094/1/2013_PedroHenriqueVianaSaavedra.pdf>.
- SCHWEICHEL, J.U.; MERKER, H.J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, pp. 253-266; 1973.
- SCULLY, C.; FIELD, J.K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1.Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncology**, pp. 256-263; 2000.
- SEELINGER, G.; MERFORT, I.; WÖLFLE, U.; SCHEMPP, C.M. Anti-carcinogenic Effects of the Flavonoid Luteolin. **Molecules**, pp. 2628-2651; 2008.
- SILVA, L.P.; AZEVEDO, R.B.; MORAIS, P.C.; VENTURA, M.M.; FREITAS, S.M. Oligomerization States of Bowman-Birk Inhibitor by Atomic Force Microscopy and Computational Approaches. **Proteins**, pp. 642–648; 2005.
- SILVA, L.P.; LEITE, J.R.S.A.; BLOCH, C.J.; FREITAS, S.M. Thermal stability of black eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI). **Protein and Peptide Letters**, pp. 33-38; 2001.
- SIMARD, J.; GINGRAS, S. Crucial role of cytokines in sex steroid formation in normal and tumoral tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, pp. 25-40; 2001.
- SMITH-WARNER, S.A.; SPIEGELMAN, D.; YAUN, S.S. *et al.* Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. **JAMA**, pp. 535-540; 1998.
- SOUZA, L.C. Associação entre o proteassoma e o inibidor de protease BTCI: caracterização físico-química e feitos moleculares em células de câncer de mama (MCF-7). Dissertação, Universidade de Brasília - DF, 2010.
- SOUZA, L.C.; CAMARGO, R.; DEMASI, M.; SANTANA, J.M.; SÁ, C.M.; FREITAS, S.M. Effects of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitoron Purified 20S Proteassome and MCF-7 Breast Cancer Cells. **Plos One**, 10 p.; 2014.
- STOLL, B.A. Western nutrition and the insulin resistance syndrome: a link to breast cancer. **Eur J Clin Nutr**, pp. 83-87; 1999.
- TAIT, J.F.; GIBSON, D.F.; SMIT, H.C. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. **Anal Biochem**, pp. 112-119; 2004.
- TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer Chemoprevention by Carotenoids. **Molecules**, pp. 3202-3242; 2012.
- TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, pp. 231–241; 2008.
- TEMPLETON, A.J.; THÜRLIMANN, B.; BAUMANN, M.; MARK, M.; STOLL, S.; SCHWIZER, M.; DIETRICH, D.; RUHSTALLER, T. Cross-sectional study of self-reported physical activity, eating habits and use of complementary medicine in breast cancer survivors. **BMC Cancer**, 8 p.; 2013.
- VALENTE, S.C.M. Marcação da Anexina V para imagem funcional da apoptose celular. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Dissertação, 2011.

- VAN ENGELAND, M.; RAMAEKERS, F.C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. **Cytometry**, pp. 131-139; 1996.
- VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L.J.; RAMAEKERS, F.C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, pp. 1-9; 1998.
- VENTURA, M.M.; ARAGÃO, J.B.; IKEMOTO, H. A Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor from Black-eyed Pea (*Vigna sinensis* L.) - Characteristics of Fluorescence. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**; 1972.
- VENTURA, M.M.; ARAGÃO, J.B. Tryptophyl Fluorescence Quenching by Iodide Ion in a Protein - An Electrostatic Effect. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**; 1973.
- VENTURA, M.M., *et al.* A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.).II – Further studies on its characterization and a reevaluation of earlier results. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, pp. 233-242; 1971.
- VENTURA; BARROS; FONSECA. Inibidor de Tripsina e Quimotripsina de *Vigna sinensis* L. Estudo de Dispersão ótica Rotatória. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, pp. 646-647; 1969.
- VENTURA, M.M.; MARTIN, C.O.; MORHY, L. A Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor from Black-eyed Pea (*Vigna sinensis* L.) - Isolation and Properties of Complexes with Trypsin and Chymotrypsin. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, pp. 335-345; 1975.
- VENTURA; MIZUTA; IKEMOTO. Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, pp. 195-201; 1981.
- VENTURA, M.M.; XAVIER-FILHO, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vignasinensis*). I. Purification and partial characterization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, pp. 553-566; 1966.
- WANG, C.; YOULE, R.J. The role of mitochondria in apoptosis. **Annu Rev Genet**, pp. 95-118; 2009.
- WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes Dev**, pp. 2922-2933; 2001.
- WEINBERG, R.A. **The Biology Of Cancer**. Garland Science, 850p; 2007.
- WEISS, J. **Ion chromatography**, pp. 12-36; 1995.
- WILCOX, C.S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? **Am J Physiol**, pp. 913-935; 2005.
- WILLIAMS, M.T.; HORD, N.G. The role of dietary factors in cancer prevention: beyond fruits and vegetables. **Nutr Clin Pract**, pp. 451-459; 2005.
- WOLF, K.; FRIEDL, P. Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. **Clin Exp Metastasis**, pp. 289-298; 2009.
- WU, A.H.; ZIEGLER, R.G.; PIKE, M.C.; NOMURA, A.M.Y.; WEST, D.W.; KOLONEL, L.N.; HORN-ROSS, P.L.; ROSENTHAL, J.F.; HOOVER, R.N. Menstrual and reproductive factors and risk of breast cancer in Asian-Americans. **Br J Cancer**, pp. 680-686; 1996.
- XAVIER-REIS, G. Purificação e análise preliminar da ação do inibidor de protease BTCI em células de linhagem de carcinoma. Faculdade Anhanguera de Brasília. Tese de Conclusão de Curso, 2011.
- XAVIER, M.E. Estudo físico-químico da associação do inibidor de serinoproteases BTCI com fluido magnético. Dissertação; 2012.
- XAVIER-FILHO, J.; VENTURA, M.M. Trypsin inhibitors in Cowpea: a review. **Comments Agric. Food Chem**, pp. 239-314; 1988.
- YAVELow, J.; COLLINS, M.; BIRK, Y.; TROLL, W.; KENNEDY, A. R. Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro. **Proc Natl Acad Sci**, pp. 5395-5399; 1985.
- ZHU, C.; QI, X.; CHEN, Y.; SUN, B.; DAI, Y.; GU, Y. PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways are involved in IGF-1-induced VEGF-C upregulation in breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, pp. 1587-1594; 2011.
- ZIMMERMAN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, pp. 57-70; 2001.