

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

**Efeitos de extrato de sementes de *Vigna unguiculata* e do inibidor de proteases BTCl, livre e encapsulado em nanopartículas, em células de câncer de mama e na prevenção de câncer de pele.**

Graziella Anselmo Joanitti

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

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal como cumprimento dos requerimentos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Brasília  
2012

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese de Doutorado....*

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

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

*Ao meu amado Alexandre, e a toda sua família, pelos momentos de alegria, pelo amor, incentivo, ajuda, compreensão e apoio dedicados a mim, e especialmente por me ajudar a superar muitas dificuldades durante o desenvolvimento dessa pesquisa.*

*Te amo!*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por seu amor infinito e por todas as graças derramadas na minha vida. “Tudo posso naquele que me fortalece.” (Filipenses 4, 13).*

*Aos meus queridos orientadores Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas. Obrigada por todos os seus preciosos ensinamentos, por seus exemplos de responsabilidade e dedicação à pesquisa, por todo apoio, atenção, oportunidades e confiança dedicadas ao meu trabalho e a mim. Obrigada pelo carinho.*

*A minha querida amiga Victoria por sempre acreditar no meu potencial como pesquisadora e por me incentivar e apoiar principalmente nos momentos difíceis e de desânimo. Muito obrigada por suas orações e sua força.*

*A minha querida amiga Jaqueline por ser um modelo de dedicação, de garra e persistência. Obrigada por seus valiosos ensinamentos e auxílios em experimentos*

*Ao meu querido amigo Luciano que é para mim modelo de pesquisador, de dedicação e de superação. A você, que foi praticamente o meu primeiro orientador, agradeço por acompanhar*

*atenciosamente o meu desenvolvimento como pesquisadora fornecendo apoio, orientação e oportunidades. Obrigada também por ser um grande amigo em meus momentos de desânimo e também de alegria.*

*Aos meus queridos estagiários, Caio e Letícia, pela colaboração crucial em muitos experimentos dessa tese (principalmente nos ensaios com camundongos), pela amizade e pelo carinho de vocês.*

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

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

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

*\* Center for Pharmaceutical Biotechnology and Nanomedicine (Northeastern University, Boston, EUA), especialmente para todos os pesquisadores e alunos do Prof. Dr. Vladimir Torchilin. Thanks for all the teachings, friendship, moments of fun, help and support!*

*You are great!*

*\* Laboratório de Microscopia Eletrônica (UnB), para os alunos do Prof. Bergmann Ribeiro e da Profa. Sonia Bao e, especialmente para a*



*Marcella, Raphael e Luis, por sua ajuda fundamental nos experimentos com camundongos e por sempre me apoiarem.*

*\* Ao grupo do Prof Dr. Luciano Paulino Silva da EMBRAPA, especialmente ao aluno de doutorado Eduardo, por auxiliar nos estudos de caracterização do extrato de sementes.*

*\* Laboratório de Bioquímica (UnB), especialmente para todos o alunos da Profa Mariana de Souza Castro.*

*\* Laboratório de Toxinologia (UnB), especialmente para todos o alunos dos professores Elizabeth Schwartz e Carlos Schwartz.*

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

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

*\* A todos os simpáticos e inteligentes alunos da Profa. Laíla Darvenne do Laboratório de Farmacognosia (UnB).*

*Obrigada por toda assistência dada a essa pesquisa, exemplos de dedicação e responsabilidade, carinho, ensinamentos, momentos de brainstorming, amizades, alegria, força e incentivo dedicados a mim.*

*A vocês toda a minha gratidão!*

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

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

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

*A Profa Dra Anamélia Bocca, seu aluno de doutorado Márcio e a técnica Viviane, pela colaboração fundamental nos ensaios de imunohistoquímica.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, em particular para as secretárias Danielle e Ana Paula. Foi muito importante para mim ter o apoio de pessoas comprometidas e competentes.*

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

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

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

## RESUMO

O câncer de mama e de pele não-melanoma são neoplasias com altas taxas de incidência e mortalidade no Brasil e no mundo. Atualmente, os tratamentos existentes para esses tipos de câncer têm eficiência moderada e causam efeitos adversos severos que diminuem a qualidade de vida do paciente. Dessa forma, existe uma busca constante por novos tratamentos e moléculas anticarcinogênicas eficientes e não indutoras de efeitos adversos severos. Estudos recentes mostraram que o inibidor de proteases BTCI, purificado de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) e pertencente à família Bowman-Birk, induziu efeitos citostáticos e citotóxicos em células de câncer de mama, sem causar alterações na viabilidade de células de mama normais. Considerando esses resultados promissores, os principais objetivos do presente trabalho foram o de otimizar os efeitos do BTCI em células de câncer de mama MCF-7, *in vitro*; e o de avaliar os efeitos do extrato de sementes de *V. unguiculata* (EB) e do BTCI na prevenção de câncer de pele não-melanoma, *in vivo*. O BTCI foi encapsulado em nanopartículas (micelas ou lipossomos) para reduzir sua agregação em meio de cultura e otimizar a entrega do inibidor diretamente no citoplasma das células MCF-7. Os resultados mostraram que lipossomos catiônicos foram as plataformas mais adequadas para a encapsulação do BTCI; mas, apesar dessas nanopartículas entregarem o inibidor no citoplasma das células MCF-7, não houve alteração na viabilidade das mesmas. A presença de outros compostos bioativos em amostras de BTCI foi investigada e mostrou que amostras com diferentes padrões de citotoxicidade em células tumorais apresentam o mesmo perfil protéico, mas quantidades de ácidos graxos diferentes. Ao longo do processo de indução química de câncer de pele não-melanoma em camundongos, observou-se que a aplicação tópica de EB ou BTCI livres reduziu significativamente: a incidência e o volume de lesões pré-malignas; a frequência de alterações histopatológicas; e a produção de mediadores inflamatórios envolvidos na progressão do tumor. Considerando os dados apresentados acima, concluiu-se que mais estudos precisam ser realizados visando esclarecer as moléculas e os mecanismos de ação envolvidos no efeito citotóxico do BTCI em células de câncer de mama. Com relação aos efeitos preventivos, o EB e o BTCI foram capazes de retardar a progressão do câncer de pele não-melanoma, provavelmente exercendo efeitos anti-inflamatórios. A confirmação desse novo dado será útil para auxiliar no desenho de novas estratégias preventivas no tratamento desse tipo de câncer e também de outras doenças relacionadas às inflamações agudas ou crônicas.

## ABSTRACT

Breast and non-melanoma skin cancer have shown high incidence and mortality rates in Brazil and around the world. Currently, the treatments available for these types of cancer show moderate efficiency and cause severe side effects reducing the patient's life quality. Therefore, there is a constant research for new and efficient treatments and anticarcinogenic molecules with low or no side effects. Recent studies reported that the Bowman-Birk protease inhibitor BTCI, extracted from *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) seeds, induced cytostatic and cytotoxic effects on breast cancer cells; while no effect on was observed on normal breast cells. In view of these promising data, the main objectives of the present work was to optimize the therapeutic effects of BTCI on breast cancer cells (MCF-7), *in vitro*; and to evaluate the effects of a crude extract (EB) from *V. unguiculata* seeds and BTCI on non-melanoma skin cancer prevention, *in vivo*. BTCI was encapsulated in nanoparticles (micelles or liposomes) in order to reduce its aggregation on culture media and to optimize the delivery of this inhibitor to the cytoplasm of MCF-7 cells. The results showed that cationic liposomes were suitable platforms for BTCI encapsulation; however, despite of delivering the inhibitor to the cytoplasm of MCF-7 cells, no cytotoxicity was observed. The presence of other bioactive compounds in BTCI samples were investigated and showed that BTCI samples with different cytotoxic patterns on cancer cells have similar protein profile, but distinct amounts of fatty acids. During the chemical induction of non-melanoma skin cancer in mice, it was shown that topic applications of BTCI or EB significantly reduced: the incidence and volume of pre-malignant lesions; the number of histopathological features; and the production of inflammatory mediators involved in tumor progression. Considering the data presented above, it was concluded that more studies are necessary to clarify the molecules and mechanisms of action involved in BTCI cytotoxicity on breast cancer cells. Regarding the preventive effects, EB and BTCI treatments were able to retard the progression of non-melanoma skin cancer, probably inducing anti-inflammatory effects. The confirmation of this new BTCI feature can be helpful to design new strategies for skin cancer prevention and also for other diseases involving acute or chronic inflammation.

## LISTA DE ABREVIACÕES

**2C5:** anticorpo monoclonal

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**BBI:** inibidor Bowman-Birk encontrado em sementes de soja

**BBIC:** extrato contendo diferentes proteínas da soja

**BSA:** albumina sérica bovina

**BTCI:** *Bowman-Birk Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor*

**CMC:** concentração micelar crítica

**COX-2:** cicloxigenase-2

**CPPs:** *cell-penetrating peptides*

**DMBA:** 7,12-Dimethylbenz(a)anthraceno

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DOPE:** dioleoilphosphatidiletanolamina

**DOTAP:** 1,2-dioleoil-3-trimetil amoniopropano

**DRV:** desidratação e reidratação

**EB:** extrato de sementes de *Vigna unguiculata*

**EPR:** *enhanced permeability and retention*

**F/T:** congelamento e descongelamento

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**HFL:** hidratação do filme lipídico

**LP:** lipossomo

**MALDI-TOF:** *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*  
(espectrômetro de massa)

**MMTV:** *mouse mammary tumor virus*

**PBS:** Tampão fosfato-salina

**PEG-PE:** 1,2-distearoil-sn-glicero-3-phosphoethanolamina-N-  
[methoxi(polietileneoglycol)]

**PGE2:** prostaglandina E2

**pI:** ponto isoelétrico

**PMSF:** *phenilmetilsulfonil fluoride*

**pNP:** *p-Nitrophenilcarbonil*

**REV:** evaporação de fase reversa

**SFB:** soro fetal bovino

**TCA:** ácido tricloroacético

**TFA:** ácido trifluoroacético

**Tf-PE:** transferrina conjugada à PEG<sub>2000</sub>-PE

**TMB:** 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (substrato para ELISA)

**TPA:** 12-O-tetradecanoilphorbol-13-acetato

**VML:** vesícula multilamelar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estágios de desenvolvimento do câncer .....	2
<b>Figura 2.</b> Características do processo de desenvolvimento do câncer.....	3
<b>Figura 3.</b> Fatores facilitadores e características emergentes do processo de desenvolvimento do câncer .....	7
<b>Figura 4.</b> Taxas de incidência de novos casos de câncer no mundo. ....	8
<b>Figura 5.</b> Distribuição dos casos de câncer no mundo por nível de desenvolvimento econômico .....	10
<b>Figura 6.</b> Estrutura geral de copolímeros anfifílicos na forma de monômeros e de micelas.....	17
<b>Figura 7.</b> Possíveis padrões de associação de moléculas às micelas .....	18
<b>Figura 8.</b> Estrutura geral de lipossomos.....	19
<b>Figura 9.</b> Interação de nanoestruturas com células.....	20
<b>Figura 10.</b> Modificações na superfície de nanoestruturas.....	21
<b>Figura 11.</b> Estrutura geral de um inibidor de protease da família Bowman-Birk.....	25
<b>Figura 12.</b> Estrutura do inibidor da família Bowman-Birk BTCI.....	26
<b>Figura 13.</b> Potenciais sítios de atuação dos inibidores de protease no processo de carcinogênese.....	27
<b>Figura 14.</b> <i>Vigna unguiculata</i> .....	39
<b>Figura 15.</b> Purificação do inibidor de proteases BTCI.....	70
<b>Figura 16.</b> Cromatograma do extrato de sementes <i>Vigna unguiculata</i> fracionado por HPLC de fase reversa .....	71
<b>Figura 17.</b> Espectros de MALDI-TOF/MS de extrato de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .....	72
<b>Figura 18.</b> Aspectos macroscópicos da pele do dorso de camundongos submetidos à indução química de câncer de pele não-melanoma.....	74

<b>Figura 19.</b> Volume total de lesões pré-malignas de câncer de pele não-melanoma.....	75
<b>Figura 20.</b> Histologia da pele do dorso de camundongos (Prancha 1).....	78
<b>Figura 21.</b> Histologia da pele do dorso de camundongos (Prancha 2) .....	79
<b>Figura 22.</b> Histologia da pele do dorso de camundongos (Prancha 3).....	80
<b>Figura 23.</b> Detecção de cicloxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E2 (PGE2) por ELISA.....	82
<b>Figura 24.</b> Imunohistoquímica para o marcador de cicloxigenase-2 (COX-2).....	83
<b>Figura 25.</b> Imunohistoquímica para o marcador de proliferação celular Ki-67.....	85
<b>Figura 26.</b> Diâmetro hidrodinâmico de moléculas de BTCI (200 µM) diluídas em diferentes soluções.....	87
<b>Figura 27.</b> Detecção de agregados de BTCI diluído em diferentes soluções.....	88
<b>Figura 28.</b> Efeito de PEG <sub>2000</sub> -PE na viabilidade celular.....	91
<b>Figura 29.</b> Efeito de PEG <sub>5000</sub> -PE na viabilidade celular.....	92
<b>Figura 30.</b> Efeito de PEG <sub>2000</sub> -PE e PEG <sub>5000</sub> -PE na viabilidade celular.....	93
<b>Figura 31.</b> Efeito de BTCI associado a PEG <sub>2000</sub> -PE na viabilidade celular.....	94
<b>Figura 32.</b> Associação de PEG <sub>2000</sub> -PE com células tumorais.....	95
<b>Figura 33.</b> Associação de PEG <sub>750</sub> -PE e PEG <sub>750</sub> -PE TAT às células.....	96
<b>Figura 34.</b> Detecção de agregados de BTCI quando diluído em PEG <sub>750</sub> -PE.....	97
<b>Figura 35.</b> ELISA de imunomicelas 2C5.....	98
<b>Figura 36.</b> Efeito de BTCI associado a PEG <sub>2000</sub> -PE 2C5 na viabilidade celular.....	99
<b>Figura 37.</b> Interferência dos lipossomos no método de dosagem de proteínas de Lowry.....	101
<b>Figura 38.</b> Interferência da adição de detergente na determinação da atividade inibitória de BTCI encapsulado em lipossomos.....	102



<b>Figura 39.</b> Efeito de formulações lipossomais na viabilidade celular.....	104
<b>Figura 40.</b> Interferência do método de encapsulação na atividade inibitória de BTCI .....	107
<b>Figura 41.</b> Estabilidade de BTCI lipossomal.....	110
<b>Figura 42.</b> Interação de BTCI lipossomal com células de câncer de mama.....	111
<b>Figura 43.</b> Cinética da interação de BTCI lipossomal com células de câncer de mama.....	112
<b>Figura 44.</b> Efeito de BTCI lipossomal na viabilidade celular.....	113
<b>Figura 45.</b> Interação de lipossomos, com ou sem transferrina, com células tumorais.....	115
<b>Figura 46.</b> Proporção de lipossomos internalizados e a influência da adição de transferrina livre na interação de lipossomos, com ou sem transferrina, com células tumorais.....	116
<b>Figura 47.</b> Efeito de BTCI lipossomal, com ou sem transferrina, na viabilidade celular.....	118
<b>Figura 48.</b> Co-localização de BTCI lipossomal e lisossomos de células de câncer de mama.....	120
<b>Figura 49.</b> Co-localização de BTCI lipossomal e lisossomos de células de câncer de colo do útero.....	121
<b>Figura 50.</b> Efeito de diferentes amostras de BTCI na viabilidade de células de câncer de mama.....	122
<b>Figura 51.</b> Atividade Inibitória de diferentes amostras de BTCI.....	123
<b>Figura 52.</b> Cromatograma de BTCI fracionado por HPLC em coluna de exclusão molecular.....	124
<b>Figura 53.</b> Cromatograma de BTCI fracionado por HPLC de fase reversa em coluna C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm).....	125
<b>Figura 54.</b> Amostras de BTCI analisadas por gel de poliacrilamida 16%.....	127
<b>Figura 55.</b> Concentração de ácidos graxos em amostras de BTCI.....	128

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Equipamentos, materiais e reagentes utilizados.....	34
<b>Tabela 2.</b> Concentrações de BTCI e extrato aplicadas no dorso de camundongos para a prevenção de câncer de pele.....	44
<b>Tabela 3.</b> Mortalidade, incidência, tempo de latência e número de lesões pré-malignas de câncer de pele não-melanoma no dorso de camundongos (n=6) após 12 semanas de tratamento com água destilada (Controle), BTCI ou extrato de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (EB).....	75
<b>Tabela 4.</b> Alterações histopatológicas de lesões pré-malignas de câncer de pele não- melanoma.....	81
<b>Tabela 5.</b> Diâmetro hidrodinâmico de moléculas de BTCI (200 µM) diluídas em diferentes soluções.....	86
<b>Tabela 6.</b> Agregados de BTCI (200 µM) diluído em diferentes soluções.....	88
<b>Tabela 7.</b> Diâmetro hidrodinâmico de moléculas de BTCI (200 µM) diluídas em PEG <sub>2000</sub> -PE após 2 horas.....	89
<b>Tabela 8.</b> Presença de agregados de BTCI (200 µM) diluído em diferentes concentrações de PEG <sub>2000</sub> -PE e incubados por 2 horas em tampão (PBS pH 7,4) ou meio de cultura (DMEM <sup>a</sup> + 10% SFB <sup>b</sup> ).....	89
<b>Tabela 9.</b> Presença de agregados de BTCI (200 µM) diluído em PEG <sub>750</sub> -PE ou PEG <sub>750</sub> -PE com o peptídeo TAT e incubados por 2 horas em tampão (PBS; pH 7,4) ou meio de cultura (DMEM <sup>a</sup> + 10% SFB <sup>b</sup> ).....	97
<b>Tabela 10.</b> Presença de agregados de BTCI (200 µM) diluído em PEG <sub>2000</sub> -PE conjugado ao anticorpo 2C5 e incubados por 2 horas em tampão (PBS pH 7,4) ou meio de cultura (DMEM <sup>a</sup> + 10% SFB <sup>b</sup> ).....	99
<b>Tabela 11.</b> Comparação de métodos para separação de BTCI não encapsulado em formulações lipossomais.....	100
<b>Tabela 12.</b> Composição de formulações lipossomais de BTCI.....	103
<b>Tabela 13.</b> Caracterização de formulações lipossomais de BTCI.....	103
<b>Tabela 14.</b> Formulações lipossomais de BTCI e eficiência de encapsulação.....	106
<b>Tabela 15.</b> Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de formulações lipossomais de BTCI.....	106

<b>Tabela 16.</b> Efeitos do tipo de sonicação utilizado no método REV no tamanho e na eficiência de encapsulação de BTCl em lipossomos.....	108
<b>Tabela 17.</b> Efeitos do tipo de solvente utilizado no método REV no tamanho e na eficiência de encapsulação de BTCl em lipossomos.....	108
<b>Tabela 18.</b> Efeitos do tipo de tampão utilizado no método REV na eficiência de encapsulação de BTCl em lipossomos.....	108
<b>Tabela 19.</b> Potencial zeta de lipossomos durante o processo de encapsulação de BTCl pelo método REV.....	109
<b>Tabela 20.</b> Atividade inibitória e quantificação da concentração de BTCl presente nas superfícies interna e externa de lipossomos preparados pelo método REV.....	109
<b>Tabela 21.</b> Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de lipossomos vazios incubados com conjugados de transferrina-PEG <sub>2000</sub> -PE.....	114
<b>Tabela 22.</b> Coeficientes para determinação de co-localização entre lipossomos/BTCl e lisossomos de células tumorais.....	121
<b>Tabela 23.</b> Área integrada de picos de amostra de BTCl fracionada por HPLC de fase reversa (figura 53).....	125

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 A biologia do câncer</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Proliferação descontrolada e insensibilidade a sinais supressores do crescimento .....	3
1.1.2 Resistência a morte celular .....	4
1.1.3 Potencial de replicação ilimitado .....	4
1.1.4 Angiogênese auto-sustentada .....	5
1.1.5 Invasão e metástase .....	5
1.1.6 Fatores facilitadores e características emergentes dos tumores .....	6
<b>1.2 Incidência mundial de câncer e prioridades para prevenção</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Câncer de mama</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4 Câncer de pele</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5 Nanotecnologia no tratamento do câncer</b> .....	<b>15</b>
1.5.1 Micelas .....	16
1.5.2 Lipossomos .....	18
1.5.3 Acúmulo e internalização de nanoestruturas em tumores .....	19
<b>1.6 Compostos anticarcinogênicos alternativos</b> .....	<b>23</b>
<b>1.7 Inibidores de protease</b> .....	<b>24</b>
1.7.1 Inibidores da família Bowman-Birk como agentes anticarcinogênicos preventivos ....	27
1.7.2 Inibidores da família Bowman-Birk como agentes anticarcinogênicos citostáticos e citotóxicos .....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 Equipamentos, materiais e reagentes utilizados</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2 Desenho experimental</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3 Produção de extrato bruto e purificação do inibidor de protease BTCI</b> .....	<b>39</b>
4.3.1 Obtenção de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .....	39
4.3.2 Preparação do extrato de sementes .....	40
4.3.3 Análise do conteúdo protéico do extrato por HPLC de fase reversa.....	41
4.3.4 Purificação do BTCI por cromatografia de troca iônica .....	41
4.3.5 Análise da pureza por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS .....	42
4.3.6 Determinação da concentração de BTCI e extrato em solução .....	42
<b>4.4 Tratamento preventivo com BTCI e extrato de sementes contra câncer de pele não-melanoma, in vivo.</b> .....	<b>43</b>

4.4.1	Indução química de câncer de pele não-melanoma e tratamento .....	43
4.4.2	Análise histológica e Imunohistoquímica.....	45
4.4.3	Detecção de COX-2 e PGE2 por ELISA .....	47
<b>4.5</b>	<b>Encapsulação de BTCl em nanoestruturas .....</b>	<b>48</b>
4.5.1	Detecção de agregados de proteína .....	48
4.5.2	Encapsulação do BTCl em micelas de PEG-PE .....	49
4.5.3	Encapsulação do BTCl em micelas de PEG-PE carregadas positivamente .....	49
4.5.4	Encapsulação do BTCl em imunomicelas de PEG-PE .....	50
4.5.5	Encapsulação do BTCl em lipossomos.....	52
4.5.5.1	Método de Hidratação do Filme Lipídico (HFL).....	52
4.5.5.2	Método de Remoção de Detergente .....	53
4.5.5.3	Método de Evaporação de Fase Reversa (REV) .....	54
4.5.5.4	Método de Congelamento e Descongelamento (F / T) .....	54
4.5.5.5	Método de Desidratação e Reidratação (DRV) .....	55
4.5.6	Modificação da superfície de lipossomos.....	56
<b>4.6</b>	<b>Caracterização das nanoestruturas .....</b>	<b>56</b>
4.6.1	Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta .....	57
4.6.2	Dosagem de lipídios.....	57
4.6.3	Determinação da porcentagem de encapsulação.....	57
4.6.3.1	Filtração / Centrifugação .....	58
4.6.3.2	Diálise.....	58
4.6.3.3	Cromatografia de exclusão molecular .....	58
4.6.4	Atividade inibitória de BTCl após encapsulação em lipossomos .....	59
4.6.5	Estabilidade .....	60
<b>4.7</b>	<b>Efeitos do BTCl na viabilidade de células de câncer de mama, <i>in vitro</i>.....</b>	<b>61</b>
4.7.1	Linhagens Celulares.....	61
4.7.2	Manutenção da cultura de células.....	61
4.7.3	Tratamento das células de câncer com BTCl livre ou encapsulado em nanoestruturas... ..	63
4.7.4	Interação de nanoestruturas com células de câncer.....	63
4.7.4.1	Citometria de Fluxo .....	64
4.7.4.2	Microscopia Confocal .....	65
4.7.5	Viabilidade Celular .....	66
<b>4.8</b>	<b>Identificação de compostos bioativos em amostras de BTCl .....</b>	<b>67</b>
4.8.1	Cromatografia de exclusão molecular e HPLC de Fase Reversa .....	67
4.8.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	68
4.8.3	Atividade inibitória e detecção de ácidos graxos.....	68

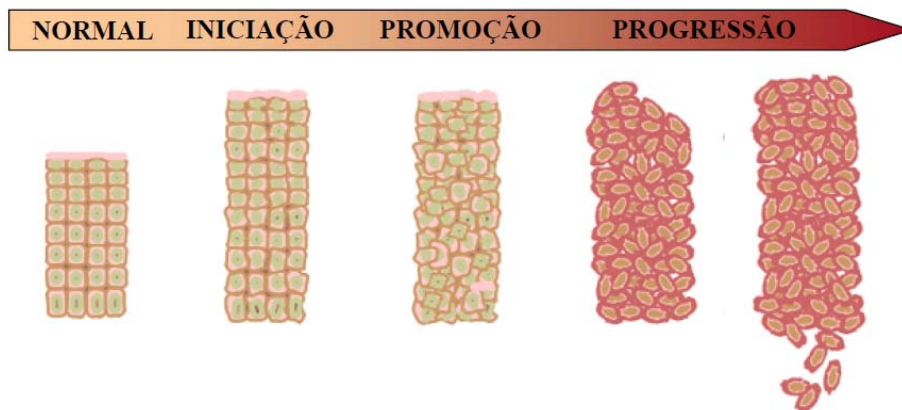
4.9 Análise estatística .....	69
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
5.1 Obtenção de extrato bruto e de BTCl.....	70
5.2 Tratamento preventivo de BTCl e extrato bruto contra câncer de pele não-melanoma, <i>in vivo</i> .....	72
5.2.1 Alterações histopatológicas.....	76
5.2.2 ELISA e Imunohistoquímica .....	81
<b>5.3 Agregação e encapsulação de BTCl em nanoestruturas .....</b>	<b>86</b>
5.3.1 Agregação do BTCl.....	86
5.3.2 Associação do BTCl com micelas de PEG-PE .....	89
5.3.3 Encapsulação do BTCl em lipossomos.....	99
<b>5.4 Identificação compostos bioativos em amostras de BTCl.....</b>	<b>122</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>129</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>150</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>152</b>
8.1 Declaração do comitê de ética no uso animal (CEUA).....	152
8.2 Carta de avaliação do doutorado sanduíche .....	153
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>154</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 A biologia do câncer**

O câncer é caracterizado por desordens celulares desencadeadas por mutações no material genético causadas por fatores genéticos, epigenéticos e/ou ambientais. Em geral, mecanismos de morte celular são acionados em células com alterações irreparáveis no DNA, para prevenir a propagação de mutações ao longo das gerações. No entanto, células tumorais apresentam alterações nesses mecanismos de regulação resultando no aumento da proliferação celular e possível invasão dessas células para outros tecidos do corpo (HANAHAN & WEINBERG, 2011). O câncer é uma patologia que ocorre em diversos tipos celulares e, devido à alterações genéticas e epigenéticas terminam por desencadear outras patologias, tornando sua cura um desafio para a medicina (WEINBERG, 2006).

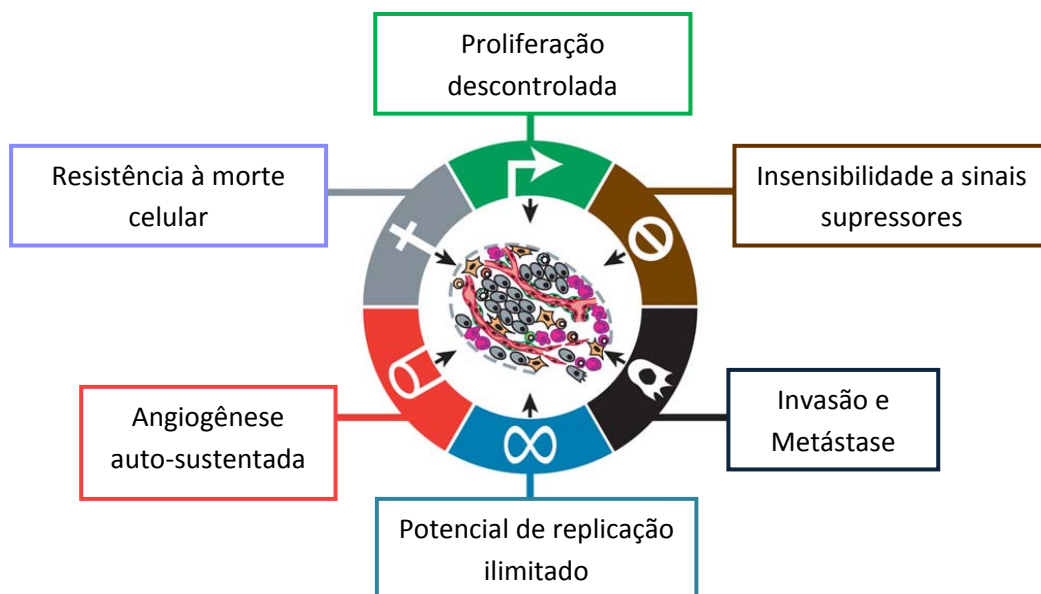
Em geral, o desenvolvimento do câncer ocorre lentamente, podendo formar um tumor muitos anos após a exposição ao agente carcinogênico. Esse processo é classicamente dividido em três estágios principais: a iniciação, promoção e progressão (Figura 1). No estágio de iniciação, as células apresentam alterações genéticas em decorrência da exposição ao agente carcinogênico. No estágio de promoção, a célula afetada inicia, lentamente, o processo de transformação maligna, caracterizado pela expressão de oncogenes. Por fim, o estágio de progressão caracteriza-se pela proliferação descontrolada e irreversível das células formando uma massa tumoral no local. Nesse último estágio algumas células podem entrar em metástase, ou seja, invadir a corrente sanguínea e se instalar em outros tecidos do organismo (BRENTANI et al., 2003).



**Figura 1.** Estágios de desenvolvimento do câncer. Iniciação: mutação genética. Promoção: transformação das células. Progressão: proliferação celular descontrolada e metástase. Adaptado de: [http://hs.riverdale.k12.or.us/~dthompo/exhib\\_03/emilty03/cancer22.gif](http://hs.riverdale.k12.or.us/~dthompo/exhib_03/emilty03/cancer22.gif).

O câncer não é apenas uma massa de células tumorais em proliferação, mas um tecido complexo formado por tipos celulares distintos participando de interações atípicas entre si e com o microambiente que o compõe. HANAHAN & WEINBERG (2011) organizaram o conhecimento acumulado sobre a biologia do câncer nos últimos anos e elencaram seis características principais presentes nesse processo (Figura 2). À medida que a célula transformada progride para estágios mais avançados, ela adquire uma sucessão dessas características, que estão resumidas a seguir.





**Figura 2.** Características do processo de desenvolvimento do câncer. Adaptado de HANAHAN & WEISBERG, 2011.

### 1.1.1 Proliferação descontrolada e insensibilidade a sinais supressores do crescimento

Tecidos normais apresentam uma regulação delicada na produção e liberação de moléculas sinalizadoras que promovem a entrada da célula em um ciclo de divisão celular, garantindo assim o número de células e a manutenção da organização e função tecidual. Células tumorais apresentam vias de sinalização intracelular alteradas e acabam respondendo aos sinais de proliferação de forma desregulada. Diferentes estratégias garantem a proliferação constante: produção de sinais de proliferação, bem como dos receptores respectivos, ativando um estímulo de proliferação autócrino; estimulação de células normais do estroma a liberarem fatores de crescimento; defeitos em mecanismo de retroalimentação negativa, super-expressão, mutação e aumento do tempo de vida de receptores para fatores de crescimento. Adicionalmente, células tumorais inativam e tornam-se insensíveis

às moléculas supressoras de crescimento (BRENTANI et al. 2003; WEINBERG, 2006; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

### **1.1.2 Resistência a morte celular**

Células tumorais alteraram a sinalização da apoptose e prosseguem na via de proliferação celular. A via de sinalização da proteína P53, dentre outras funções, controla a expressão e atividade de moléculas bloqueadoras do ciclo celular e a indução da apoptose. Essa via é bloqueada em aproximadamente 50% dos tipos de câncer que, dessa forma, impedem a ativação da mesma (CHIPUK et al., 2006). Outros mecanismos de resistência à apoptose presentes no câncer podem ser: o aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2; Bcl-x) e mutação/supressão das pró-apoptóticas (Bax, Bin), além de alterações na expressão de receptores transmembrana sinalizadores de apoptose (WEINBERG, 2006; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

### **1.1.3 Potencial de replicação ilimitado**

O número de divisões no processo de replicação de células diplóides normais é controlado, ocorrendo apenas de 60 a 70 vezes. Ao atingir esse limite, as células são induzidas à senescência e depois à morte. O número definido de divisões é determinado pela extensão dos telômeros, localizados na porção final dos cromossomos, que diminuem a cada ciclo celular. Entretanto, em células tumorais, a extensão dos telômeros é estabilizada pelo aumento na expressão de telomerase, mantendo assim um número infinito de replicações (WEINBERG, 2006; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

#### **1.1.4 Angiogênese auto-sustentada**

Assim como em tecidos normais, os tumores necessitam receber um aporte de oxigênio e nutrientes e descartar gás carbônico e metabólitos. Essas necessidades são sanadas pela ativação constante de um processo de angiogênese, no qual vasos sanguíneos normalmente quiescentes são induzidos a proliferar e se expandir pelo tumor. Devido a um desbalanço dos fatores pró-angiogênicos, os vasos sanguíneos recém-formados são tipicamente aberrantes. Apresentam muitas ramificações, fluxo sanguíneo errático, micro-hemorragias e proliferação anormal de células endoteliais (WEINBERG, 2006; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

#### **1.1.5 Invasão e metástase**

O processo de invasão e metástase é caracterizado por uma seqüência de etapas decorrentes de sucessivas mudanças nas células. Primeiramente, ocorre uma invasão local de células tumorais para vasos sanguíneos e/ou linfáticos próximos. Para realizar essa invasão, as células tumorais diminuem a expressão de junções de adesão reduzindo assim sua adesão a outras células e também com a matriz extracelular. As células transitam pelos vasos, escapam para o parênquima de um tecido mais distante, formam pequenos nódulos e, finalmente, estabelecem tumores macroscópicos. A comunicação das células tumorais com células do estroma é importante para esse processo. Por exemplo, macrófagos podem facilitar a invasão local secretando metaloproteases e cisteínoproteases relacionadas com a destruição da matriz extracelular (WEINBERG, 2006; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

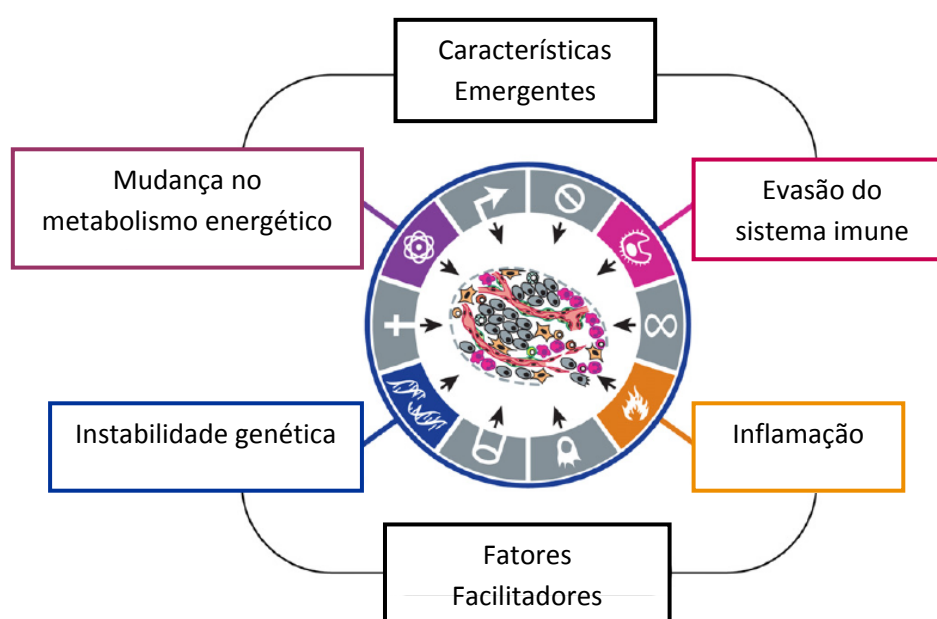
### **1.1.6 Fatores facilitadores e características emergentes dos tumores**

A instabilidade genética e a inflamação tem sido descritos como facilitadores no estabelecimento das características do câncer (Figura 3). A instabilidade genética gera mutações randômicas, incluindo rearranjos de cromossomos e mutação raras. A inflamação constante também está relacionada à progressão dos tumores. Ela ocorre em lesões pré-malígnas e malígnas e é ocasionada por células do sistema imune ali presentes (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

A habilidade das células tumorais em mudar o metabolismo energético e escapar do sistema imune são duas importantes características para o desenvolvimento do câncer e foram classificadas por HANAHAN & WEINBERG (2011) como características emergentes (Figura 3), por não estarem completamente elucidadas. Células tumorais apresentam alguns ajustes no metabolismo energético para manter as taxas de proliferação celular. Mesmo na presença de oxigênio, as células reprogramam seu metabolismo de glicose limitando-o principalmente à etapa da glicólise. Aparentemente, esse reajuste não parece conferir vantagens energéticas, uma vez que a glicólise produz 18 vezes menos energia que a fosforilação oxidativa. No entanto, o aumento nas taxas de glicólise permite a entrada de diversos intermediários glicolíticos em vias de biossíntese, facilitando a produção de macromoléculas e organelas necessárias para as novas células (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Células do sistema imune estão monitorando tecidos constantemente e são capazes de identificar e destruir células tumorais, uma vez que as mesmas são altamente imunogênicas. No entanto, alguns tumores conseguem evadir do sistema imune evitando serem detectados ou limitando sua atuação. Os mecanismos

utilizados pelas células tumorais ainda estão sob investigação, mas algumas evidências já foram encontradas. Por exemplo, células tumorais paralisam a infiltração das células do sistema imune secretando fatores imunossupressores. As figuras 2 e 3 resumem as características tumorais discutidas e ilustram a complexidade dos mecanismos celulares envolvidos na progressão do câncer (WEINBERG, 2006; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

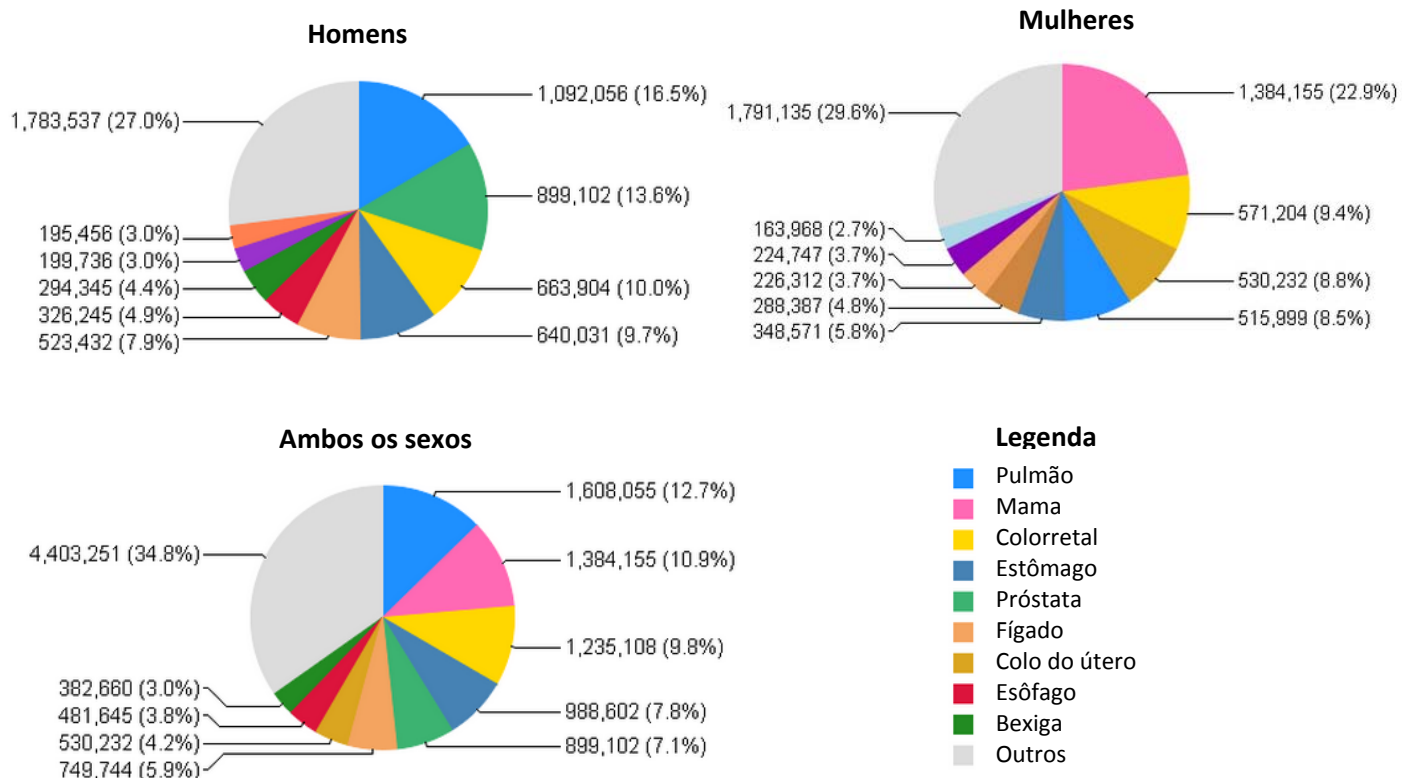


**Figura 3.** Fatores facilitadores e características emergentes do processo de desenvolvimento do câncer. Adaptado de HANAHAN & WEISBERG, 2011.

## 1.2 INCIDÊNCIA MUNDIAL DE CÂNCER E PRIORIDADES PARA PREVENÇÃO

Câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Estimativas apontam que cerca de 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes por câncer ocorreram no mundo em 2008 (GLOBOCAM, 2008). Considerando que o número de casos da doença vem aumentando a cada ano, previsões feitas para o

ano de 2030 sugerem o aparecimento de 20 a 26 milhões de novos casos e 13 a 17 milhões de mortes (WHO, 2011). A figura 4 mostra os tipos de câncer de maior incidência no mundo.



**Figura 4.** Taxas de incidência de novos casos de câncer no mundo. Dados do ano de 2008. Adaptado de GLOBOCAM 2008.

Apenas cerca de 5 a 10% dos cânceres são derivados de oncogenes hereditários. Portanto, cerca de 90% dos casos de câncer tem início com a exposição à fatores ambientais e/ou hábitos comportamentais (IRIGARAY et al., 2007). A revolução industrial, em meados do século XIX, produziu e introduziu no meio ambiente inúmeras substâncias químicas fabricadas pelo homem sem o devido controle toxicológico. Tais produtos podem atuar como poluentes tóxicos

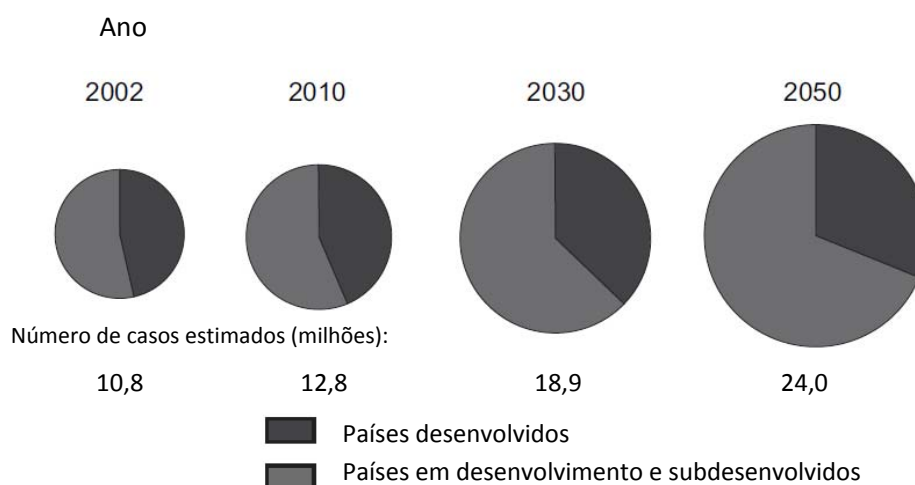
persistentes e contaminar ar, solo, água e alimentos. Além disso, eles podem atuar como agentes mutagênicos ou promotores de câncer (IRIGARAY et al., 2007).

A exposição à radiação também contribui para o aumento das taxas de incidência do câncer e está relacionada não só com câncer de pele, mas a outros tipos de câncer, como de mama, pulmão, tireóide e do sistema hematológico (NIH, 2011). As principais fontes de exposição para a população são a radiação solar e também radiações advindas de exames médicos, como raios-X e tomografia computadorizada (NIH, 2011). Outro fator ambiental importante é a infecção causada por vírus e outros microorganismos. Estimativas apontam que agentes infecciosos estão relacionados à aproximadamente 18% de todos os casos de câncer no mundo. Os principais agentes envolvidos são o vírus HPV, vírus da hepatite B ou C, vírus *Epstein-Barr* e parasitas associados à inflamações crônicas como a bactéria *Helicobacter pylori* (THUN et al., 2010).

Um crescente número de pesquisas epidemiológicas tem mostrado que hábitos comportamentais referentes a baixa frequência na prática de exercícios físicos, elevado consumo de álcool e tabaco, alimentação com excesso de carne vermelha e gorduras, e sobrepeso / obesidade também contribuem para o aumento no número de casos de câncer. Esses hábitos não causam necessariamente mutações no DNA, mas podem atuar como agentes co-carcinogênicos, aumentando a predisposição fisiológica de um organismo à desenvolver a doença (IRIGARAY et al., 2007; THUN et al., 2010). No caso do consumo de tabaco, além de conter substâncias co-carcinogênicas, sua fumaça contém centenas de substâncias mutagênicas (nitrosaminas, por exemplo). Sendo assim, esse hábito se destaca como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer tanto

para o fumante ativo quanto para o fumante passivo (IRIGARAY et al., 2007; NIH, 2011).

O panorama da distribuição global do câncer têm mostrado alterações com relação às regiões de maior incidência (Figura 5). Previsões apontam que no ano de 2050, mais de 60% de todos os casos de câncer no mundo ocorrerão em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (THUN et al., 2010). Essa estimativa representa não só um impacto na saúde da população, mas também na economia desses países, uma vez que muitos deles não poderão financiar aumentos excessivos nos gastos para o tratamento dessa doença (THUN et al., 2010).



**Figura 5.** Distribuição dos casos de câncer no mundo por nível de desenvolvimento econômico. Adaptado de THUN et al., 2010.

Considerando que o câncer é uma patologia complexa de incidência multifatorial, que as taxas de incidência ao longo dos anos tem aumentado e que os tratamentos disponíveis são dispendiosos e nem sempre resultam na cura, a implementação de medidas de prevenção vêm sendo apontada como uma estratégia eficiente e mais barata para a redução nas taxas de incidência e



mortalidade (THUN et al., 2010). O acúmulo de informações sobre a correlação entre fatores de risco e incidência da doença permite concluir que uma proporção considerável dos casos de câncer no mundo poderiam ser prevenidos com programas para o controle do consumo de tabaco, vacinações contra agentes infecciosos, exames periódicos, bem como a implementação de campanhas de saúde pública, promovendo a prática de exercícios físicos e uma alimentação mais saudável (THUN et al., 2010). A intensificação nos estudos e pesquisas sobre fatores de risco para o desenvolvimento do câncer, bem como trabalhos enfatizando a busca por compostos naturais ou sintéticos que possam atuar como agentes preventivos também contribuem para a redução das taxas de incidência dessa doença.

### **1.3 CÂNCER DE MAMA**

O câncer de mama é o primeiro tipo de câncer mais freqüente em mulheres no mundo (Figura 4). O Brasil apresenta elevadas taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama. As estimativas para o ano de 2012 apontam que ocorrerão 52.680 novos casos e 11.969 mortes em mulheres (INCA, 2012). A incidência do câncer de mama ocorre principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Entre as capitais, Brasília ocupa o quinto lugar de maior incidência desse tipo de câncer (INCA, 2006), com estimativa de 880 novos casos para o ano de 2012 (INCA, 2012).

A mama é constituída basicamente de tecido adiposo, tecido conjuntivo e tecido glandular. Esse tecido age em resposta a hormônios como estrógeno, progesterona, insulina e fatores de crescimento (NIH, 2005). O câncer de mama é

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

Os fatores de risco para o câncer de mama não são bem conhecidos. Apesar disso, pesquisadores identificaram características comuns entre mulheres que desenvolvem a doença. Cerca de 4 a 9% dos casos de câncer de mama são hereditários e geralmente causados pela mutação nos genes das proteínas BRCA1 e BRCA2 (AICR, 2007). Os fatores de risco atribuídos para o restante dos casos são: idade acima de 60 anos; histórico familiar da doença; falta de atividade física; excesso de peso; dieta; hormônios exógenos (contraceptivos e terapia de reposição hormonal); menarca precoce; menopausa tardia; nuliparidade; primeira gravidez tardia (acima dos 30 anos) e consumo de álcool e tabaco (NIH, 2005; AICR, 2007).

O exame clínico das mamas e a mamografia são os métodos mais recomendados para o diagnóstico precoce da doença. Quando detectado em estágios iniciais, o câncer de mama apresenta um bom prognóstico com taxa de sobrevivência de 65%. Apesar disso, no Brasil, as taxas de mortalidade por esse tipo de câncer continuam elevadas, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados (INCA, 2012).

Os tratamentos mais utilizados atualmente são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal e a imunoterapia. A aplicação dos tratamentos varia

de acordo com o estágio de desenvolvimento e localização do tumor. A cirurgia consiste na remoção total ou parcial da mama e de nódulos linfáticos adjacentes e, em alguns casos, dos ovários, podendo causar diversos efeitos adversos como: diminuição da autoestima, devido à mutilação do órgão; fraqueza no braço adjacente a cirurgia e suor nas mãos (NIH, 2005). Os principais efeitos adversos da radioterapia são danos em células normais, secura e vermelhidão na área tratada e cansaço (NIH, 2005). O tratamento de quimioterapia consiste no uso de drogas aplicadas endovenosamente que atingem preferencialmente células com elevadas taxas de proliferação, ou seja, as células cancerígenas. Os efeitos adversos desse tratamento variam de acordo com o tipo de droga utilizada e consistem em morte de células sanguíneas, alopecia (queda de cabelo), alterações gastrintestinais (náuseas, vômito e diarreia), perda de apetite e infertilidade (NIH, 2005).

A terapia hormonal consiste na diminuição da produção de hormônios importantes para o desenvolvimento da célula tumoral, como o estrogênio. Os principais medicamentos de escolha são moduladores seletivos da expressão de receptores ou inibidores da síntese de estrogênio. Alguns efeitos adversos desse tratamento são: náuseas, irregularidade nos períodos menstruais, alterações do endométrio, diminuição da libido, dores de cabeça, calores intensos e vagina ressecada (NIH, 2005). A imunoterapia baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais específicos contra proteínas de células tumorais, auxiliando o sistema imune no combate contra as células cancerígenas. Dores de cabeça, febres, náuseas, diarreias, danos no coração e pulmão são alguns dos efeitos adversos da terapia (NIH, 2005).

## 1.4 CÂNCER DE PELE

É o câncer mais freqüente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. O número de novos casos de câncer de pele não-melanoma estimado para o Brasil no ano de 2012 é de 62.680 entre homens e de 71.490 nas mulheres. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na Região Sul, Sudeste e Centro-Oeste (INCA, 2012). Quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada; porém sua incidência é baixa (estimativas de 3.170 novos casos em homens e 3.060 novos casos em mulheres em 2012) (INCA, 2012).

O câncer de pele é caracterizado por uma proliferação descontrolada de células presentes nas diversas camadas da epiderme. O desenvolvimento do câncer de pele depende do tipo de célula mutada. De uma forma geral, mutações em células basais desenvolvem-se em cânceres de crescimento lento com raras metástases (carcinoma basocelular); já mutações em células escamosas desenvolvem-se em cânceres com maior propensão à metástase (carcinoma epidermóide) (NIH, 2005; MADAM, 2010). Mutações ocorridas nas células produtoras de melanina, os melanócitos, culminam no desenvolvimento do melanoma. Esse tipo de câncer frequentemente está associado à metástases agressivas, podendo migrar para qualquer parte do corpo e se instalar em linfonodos, fígado, pulmões e cérebro. Os principais sintomas do câncer de pele são a incidência e/ou alterações na cor, textura e forma de manchas e pintas (NIH, 2009).

Dentre os fatores de risco para o câncer de pele destacam-se: a radiação ultravioleta (principal), fatores genéticos, cor de pele branca, cicatrizes,

queimaduras, infecções de pele, dentre outros. O câncer de pele não-melanoma apresenta altos percentuais de cura, se for detectado precocemente. Os principais tratamentos utilizados atualmente são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e a terapia fotodinâmica. A aplicação dos tratamentos varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do tumor (NIH, 2009).

A cirurgia consiste na remoção total ou parcial da lesão. Tal procedimento pode causar efeitos adversos como cicatrizes profundas. A radioterapia apresenta efeitos adversos como secura e vermelhidão na área tratada. Alguns efeitos adversos da quimioterapia consistem: no inchaço, dor, feridas, vermelhidão, entre outros. A terapia fotodinâmica consiste na ativação de um fármaco, aplicado no local da lesão, por um laser e posterior destruição do tumor. Os efeitos adversos desse tratamento são feridas e vermelhidão local (NIH, 2009).

## **1.5 NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER**

Apesar do desenvolvimento de novas técnicas para a utilização mais eficaz dessas terapias, efeitos adversos severos, como citados acima, contribuem para o aumento significativo das taxas de morbidade nos pacientes. A falta de especificidade das terapias anticarcinogênicas para a célula tumoral leva a danos em células sadias, intensificando assim os efeitos adversos (SZEIMIES et al., 2006). Agentes quimioterápicos que atingem o DNA ou microtúbulos, da forma que são aplicados, já foram descritos como não específicos para tumores de mama, por exemplo (SLEDGE et al., 2001).

Alternativas para melhorar a eficiência na absorção e no direcionamento de agentes anticarcinogênicos especificamente para células tumorais vêm sendo estudadas, intensamente, com o emprego dos sistemas nanoestruturados. Nanoestruturas (1 a 1000 nm) vêm sendo empregadas em diversos campos da medicina, favorecendo as áreas de diagnóstico, imagem, terapia e prognóstico de patologias como o câncer (SAAD et al., 2008; MALAM et al., 2009).

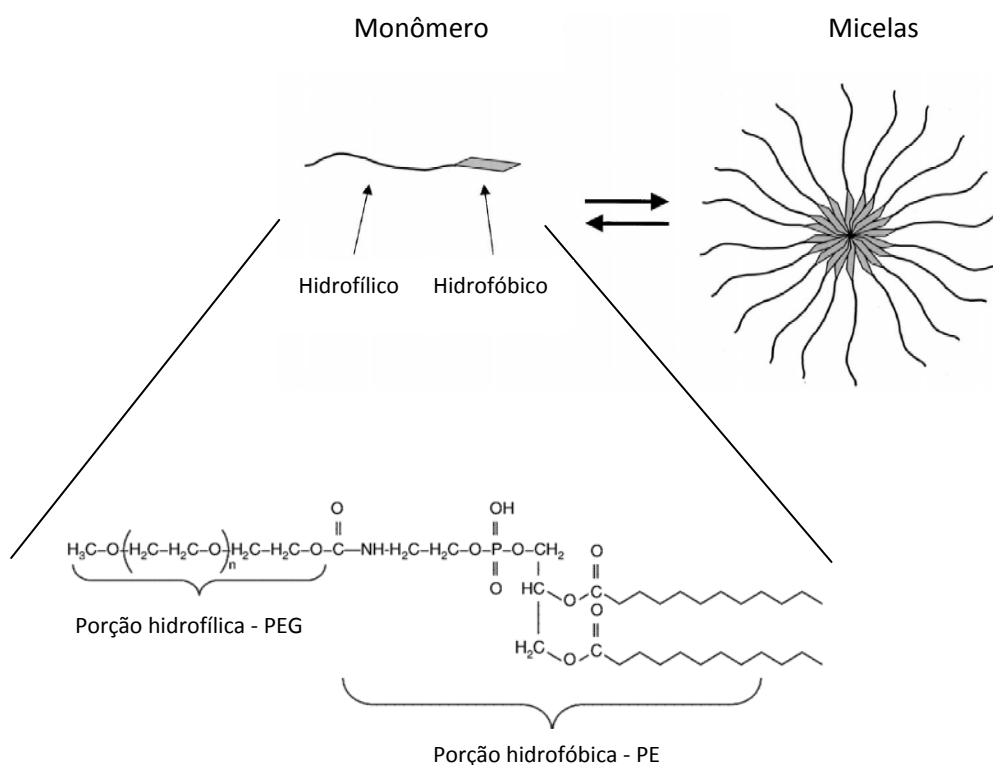
A utilização de nanoestruturas como carregadores de drogas anticarcinogênicas tem como objetivos minimizar a degradação ou inativação da droga após administração, prevenir efeitos adversos e aumentar a quantidade de droga no local do tumor (TORCHILIN, 2007; MALAM et al., 2009). Para tanto, espera-se que tais nanoestruturas sejam biodegradáveis; de fácil preparo e de baixo custo; apresentem pequeno tamanho (< 600 nm), mas com capacidade de transportar grandes quantidades de drogas; permaneçam na corrente sanguínea por tempo prolongado; e que sejam acumuladas especificamente no local do tumor (TORCHILIN, 2007). Existe uma grande variedade de nanosistemas de naturezas poliméricas, lipídicas ou metálicas. As micelas e os lipossomos estão dentre as nanoestruturas mais estudadas para esse fim.

### **1.5.1 Micelas**

As micelas são dispersões coloidais com tamanho variando entre 10 a 100 nm. São formadas pela auto-organização de copolímeros anfifílicos em solução aquosa, formando uma nanoestrutura com região central de caráter hidrofóbico e de superfície hidrofílica (Figura 6) (TORCHILIN, 2001; SAWANT & TORCHILIN, 2010). A porção hidrofílica geralmente é constituída por polímeros como o polietilenoglicol (PEG), com massas moleculares de 1 a 15 kDa (TORCHILIN, 2001; SAWANT &

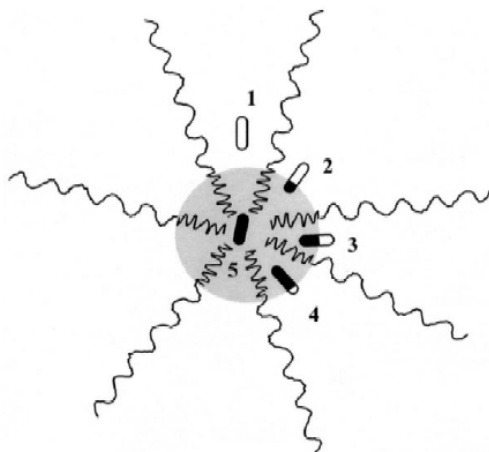
TORCHILIN, 2010). A porção hidrofóbica pode ser composta por polímeros pouco solúveis ou por porções hidrofóbicas de fosfolipídios, como a fosfatidiletanolamina (Figura 6).

A estabilidade das micelas varia de acordo com o tipo e a concentração dos copolímeros. Em baixas concentrações, os copolímeros permanecem em seu estado monomérico. À medida que a concentração aumenta, os monômeros tendem a se agrupar e formar micelas (Figura 6). A concentração mínima de copolímeros necessária para a formação de micelas é definida como concentração micelar crítica (CMC) (TORCHILIN, 2001; SAWANT & TORCHILIN, 2010).



**Figura 6.** Estrutura geral de copolímeros anfifílicos na forma de monômeros e de micelas. A estrutura química representada corresponde ao copolímero de PEG-PE (polietilenoglicol-fosfatidiletanolamina). Adaptado de TORCHILIN, 2001.

As micelas são utilizadas para aumentar a solubilidade e melhorar a biodistribuição de drogas anticarcinogênicas hidrofóbicas, que ocupam preferencialmente a região central da micela. Compostos com características hidrofóbicas/hidrofílicas intermediárias também podem associar-se a outras regiões das micelas (Figura 7) (TORCHILIN, 2001; SAWANT & TORCHILIN, 2010).



**Figura 7.** Possíveis padrões de associação de moléculas às micelas. 1) Moléculas hidrofílicas; 2 a 4) Moléculas com características hidrofílicas/hidrofóbicas intermediárias; 5) Moléculas hidrofóbicas. Adaptado de TORCHILIN, 2001.

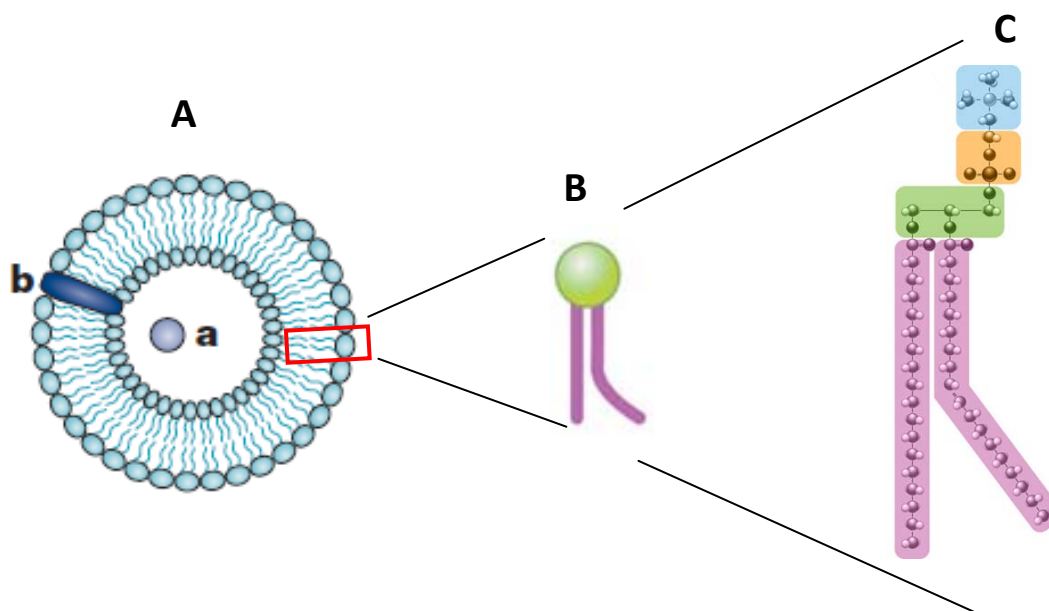
### 1.5.2 Lipossomos

Os lipossomos foram descritos em 1960 e são uma das nanoestruturas carreadoras de fármacos mais bem estudadas e caracterizadas (FAROKHZAD et al., 2009). São vesículas, compostas por uma bicamada fosfolipídica, variando de 50 a 1000 nm em tamanho e podem carrear compostos de natureza hidrofílica (proteínas, DNA, RNA), em seu interior, ou compostos de natureza hidrofóbica, entre a bicamada (Figura 8) (CHO et al., 2008; MALAM et al., 2009).

Os lipossomos são biologicamente inertes, biocompatíveis e não causam toxicidade ou reações antigênicas. Suas propriedades físicas e químicas como carga, permeabilidade e



hidrofobicidade baseiam-se nas características dos fosfolipídios os quais podem ser naturais ou sintéticos (TORCHILIN, 2007; MALAM et al., 2009).



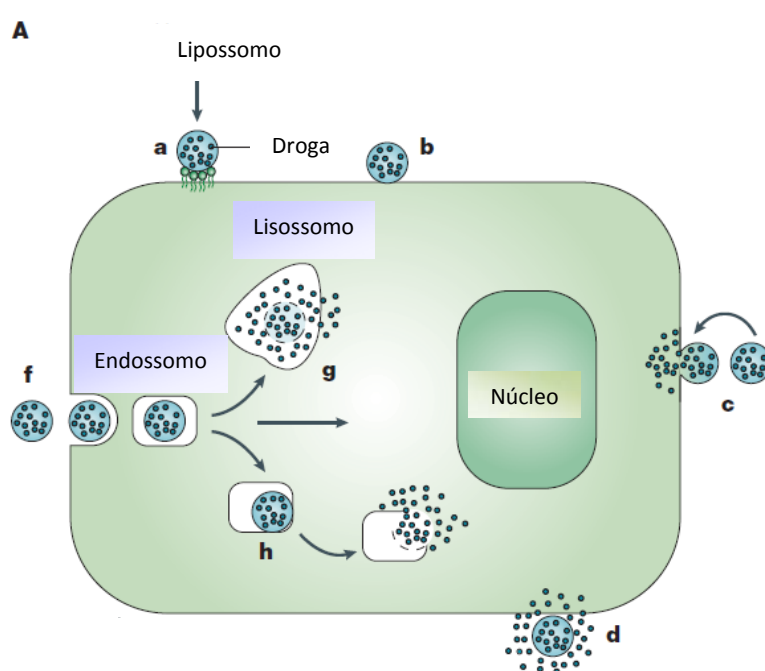
**Figura 8.** Estrutura geral de lipossomos. A) Localização de compostos hidrofílicos (a) e hidrofóbicos (b) quando encapsulados em lipossomos. B) Fosfolipídio composto de 2 regiões principais: hidrofílica (verde) e hidrofóbica (roxo). C) Sub-regiões do fosfolipídio. Fosfatidilcolina está representada como exemplo. A cabeça é composta por colina (azul) e grupamento fosfato (laranja) e está conectada ao grupamento glicerol (verde), que por sua vez, está ligado a duas cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos (roxos). O dobramento mostrado em uma das cadeias hidrofóbicas (roxos) ocorre devido às insaturações presentes na cadeia. Adaptado de TORCHILIN, 2005 e SCITABLE et al., 2012.

### 1.5.3 Acúmulo e internalização de nanoestruturas em tumores

As nanoestruturas se acumulam preferencialmente nos tecidos tumorais devido ao efeito EPR (*enhanced permeability and retention*). Defeitos no sistema de drenagem linfática e a presença de espaços, de 200 a 600 nm, entre as células endoteliais da vasculatura tumoral, facilitam o extravasamento e o acúmulo de nanoestrutura no espaço intersticial do tumor. Esse tipo de acúmulo é denominado de passivo (TORCHILIN, 2007). Uma vez presentes na região do tumor, as nanoestruturas podem liberar o seu conteúdo no espaço intersticial ou serem internalizadas pelas células tumorais e liberar seu conteúdo no espaço

intracelular. Essa possibilidade é particularmente interessante para drogas anticarcinogênicas que tem como alvo moléculas intracelulares (TORCHILIN, 2007; MALAM et al., 2009).

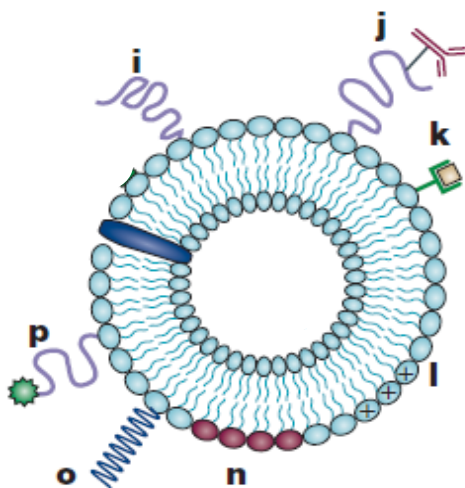
Os mecanismos de interação e internalização variam de acordo com a natureza da composição, tamanho e características da superfície das nanoestruturas. A figura 9 destaca alguns desses mecanismos.



**Figura 9.** Interação de nanoestruturas com células. Nanoestruturas podem adsorver na superfície das células de forma específica (a) ou não específica (b). A liberação do conteúdo das nanoestruturas pode ocorrer logo após adsorção (d) ou após a fusão da nanoestrutura com a célula (c). As nanoestruturas podem ser internalizadas por vias de endocitose (f) e liberar seu conteúdo antes (h) ou depois de serem direcionadas aos lisossomos (g). Adaptado de TORCHILIN, 2005.

A superfície de nanoestruturas pode ser modificada por uma variedade de motivos para conferir determinadas propriedades e funcionalidades às mesmas (Figura 10). A adição de polímeros de PEG, por exemplo, prolonga o tempo de circulação das nanoestruturas e intensifica o seu acúmulo nos tumores pelo efeito EPR (TORCHILIN, 2005; TORCHILIN,

2007). O acoplamento de anticorpos monoclonais específicos e também de outros motivos, como folato ou transferrina, conferem às nanoestruturas habilidades de reconhecer e se ligar especificamente a tecidos e células alvo. A habilidade de responder a estímulos do ambiente patológico pode ser conferida pela adição de componentes sensíveis ao pH, temperatura ou a outro estímulo químico. Adicionalmente, o aumento na internalização das nanoestruturas pelas células pode ser conferido pela modificação da superfície das nanoestruturas com a adição de CPPs (*cell-penetrating peptides*) (TORCHILIN, 2005; TORCHILIN, 2007).



**Figura 10.** Modificações na superfície de nanoestruturas. Diversos motivos podem ser usados para tal modificação como o acoplamento de: polímeros para proteção (i); anticorpos (j); marcadores para diagnóstico e imagem (k); cargas positivas (l); lipídios ou polímeros sensíveis a estímulos (n, o); *cell-penetrating peptides* (p). A estrutura geral de lipossomos foi usada como exemplo, mas micelas também podem apresentar modificações semelhantes em sua superfície. Adaptado de TORCHILIN, 2005.

Diversas drogas quimioterápicas têm sido associadas às micelas ou lipossomos como a doxorrubicina, paclitaxel, adramicina e vincristina (KIM et al., 2001; TORCHILIN, 2007; CHO et al., 2008; FAROKHZAD et al., 2009). O encapsulamento da droga doxorrubicina em lipossomos tem mostrado resultados satisfatórios no tratamento terapêutico do câncer. A ligação de anticorpos específicos para tumores em lipossomos

contendo doxorubicina resultou no aumento significativo da citotoxicidade da droga em células de carcinoma pulmonar e de próstata (SAAD et al., 2008; TORCHILIN, 2007; MALAM et al., 2009). A aplicação de lipossomos contendo a droga docetaxel, com ligantes específicos para tumores de próstata, reduziu significativamente o volume do tumor quando comparado a aplicação da droga livre (FAROKHZAD et al., 2006). Similarmente, paclitaxel associado a micelas, contendo em sua superfície anticorpos monoclonais específicos para células tumorais, também apresentaram maior citotoxicidade em células de melanoma e de câncer de mama (TORCHILIN et al., 2003).

A superfície das nanoestruturas pode ser modificada com o acoplamento de mais de um motivo, apresentando assim habilidades multifuncionais (Figura 10). Por exemplo, lipossomos contendo doxorubicina, utilizados no tratamento de células tumorais, apresentaram melhor internalização e citotoxicidade quando anticorpos monoclonais específicos, CPPs e compostos sensíveis ao pH foram acoplados, simultaneamente, em sua superfície (KOREN et al., 2011).

Algumas formulações lipossomais já foram aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estão sendo comercializadas, como a doxorubicina lipossomal PEGlada (Doxil<sup>®</sup> nos EUA e Caelyx<sup>®</sup> fora dos EUA) e a daunorubicina lipossomal PEGlada (DaunoXome<sup>®</sup>) (GABIZON et al., 1998; HALEY et al., 2008). Uma terceira formulação também foi aprovada na Europa: a doxorubicina lipossomal não PEGlada (Myocet<sup>®</sup>). Essas formulações vêm sendo empregadas no tratamento terapêutico de câncer de mama (GABIZON et al., 1998; CHO et al., 2008; HALEY et al., 2008). Drogas anticarcinogênicas, como o paclitaxel, encapsuladas em micelas estão na fase de ensaios clínicos (SAIF et al., 2010) e vêm mostrando resultados promissores.

## 1.6 COMPOSTOS ANTICARCINOGENICOS ALTERNATIVOS

Todas as características do processo de desenvolvimento do câncer (item 1.1) são potenciais alvos para tratamentos terapêuticos. De fato, algumas drogas visando esses alvos já foram testadas, mas os resultados obtidos não foram exatamente os esperados. Por exemplo, o uso de potentes inibidores da angiogênese resultou em uma redução da neovascularização de tumores. No entanto, as células tumorais reagiram a esse tratamento ativando processos de invasão e metástase (AZAM et al., 2010). Os tratamentos que utilizam quimioterapia e radioterapia matam células tumorais induzindo apoptose. No entanto, poucos cânceres são sensíveis a essas terapias devido às desconexões existentes na via apoptótica, e terminam por adquirir resistência ao tratamento (IGNEY et al., 2002). Esses resultados evidenciam a heterogeneidade e versatilidade das células tumorais e enfatizam porque o tratamento do câncer ainda é considerado um desafio.

Agentes anticarcinogênicos que induzam o bloqueio ou a destruição das células tumorais por mecanismos de ação alternativos podem ser usados em combinação com tratamentos já existentes, atingindo assim diferentes alvos simultaneamente e aumentando as chances de destruição do tumor. Atualmente, um número limitado desses agentes está disponível. Dessa forma, há uma necessidade de encontrar ou melhorar as ferramentas e estratégias disponíveis para a prevenção e o tratamento do câncer.

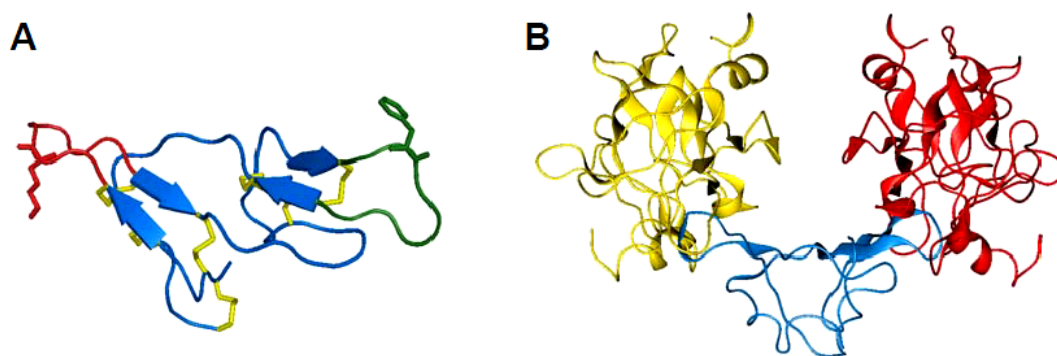
Aproximadamente, um quarto de todos os medicamentos fabricados e consumidos hoje possui substâncias derivadas de plantas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, de 252 medicamentos considerados básicos e essenciais, 11% são exclusivamente extraídos de plantas e outra importante proporção é derivada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

compostos extraídos de plantas chamou a atenção do Instituto Nacional do Câncer dos EUA que, entre 1960 e 1982, realizou testes anticarcinogênicos com mais de 35.000 amostras (MANN, 2002). Apesar do potencial efeito citotóxico desses compostos contra células de câncer, muitos deles ainda apresentaram efeitos adversos severos (CELLA et al., 2006). Sendo assim, a busca por novas moléculas anticarcinogênicas extraídas de plantas ainda continua. Plantas consumidas normalmente na dieta dos seres humanos contêm diversas moléculas com potencial anticarcinogênico com chances de não causar efeitos adversos severos (KENNEDY, 1998 a). Por exemplo, o consumo de leguminosas (feijões, ervilhas, soja) está associado a baixas taxas de incidência e mortalidade por câncer, especialmente para os cânceres de mama, cólon e próstata (KENNEDY, 1998 a). Essas evidências deram início a uma série de investigações de prováveis componentes anticarcinogênicos de leguminosas (KENNEDY, 1998 b; KELLOFF et al., 2000).

## 1.7 INIBIDORES DE PROTEASE

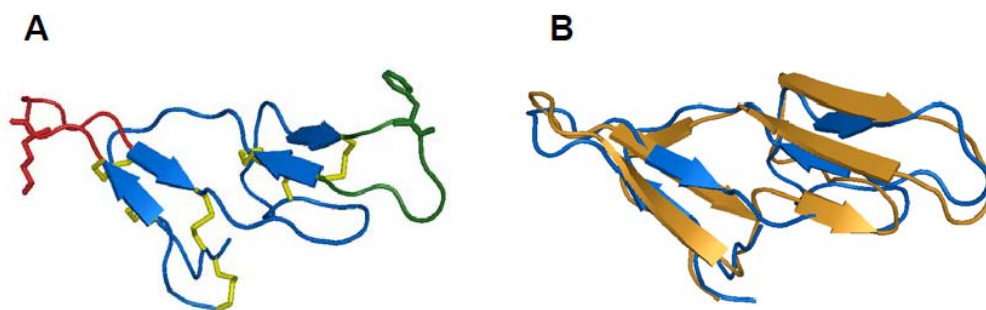
Diversos compostos bioativos com atividades anticarcinogênicas já foram encontrados em leguminosas. Os principais deles são as isoflavonas, peptídeos e inibidores de protease (JOANITTI et al., 2011). Os inibidores de protease (IPs) são encontrados em diferentes sementes de leguminosas: feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), soja (*Glycine max*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*) e lentilha (*Lens culinaris*) (LOSSO, 2008). Nas plantas, eles são comumente descritos como componentes importantes na defesa contra ataques de predadores e infecções por microorganismos, ambos associados à atividade de inibição de proteases (CARLINI et al., 2002). A concentração de IPs varia com o estágio de desenvolvimento da semente, sendo que maiores concentrações dessas moléculas são encontradas em sementes não germinadas (PARK et al., 2005).

Os PIs estão classificados em mais de 20 famílias de acordo com sua estrutura e atividade inibitória (LOSSO, 2008). A família Bowman-Birk é uma das principais famílias encontradas em sementes de leguminosas e estão envolvidas na inibição de serinoproteases (JOANITTI et al., 2011; LOSSO, 2008). São moléculas pequenas apresentando de 60 a 90 resíduos de aminoácidos e 8 a 10 kDa de massa molecular. Em sua maioria, os inibidores Bowman-Birk inibem principalmente tripsina e quimotripsina. Apresentam uma rede de ligações dissulfeto (5 a 7 ligações) que conferem maior estabilidade e rigidez às moléculas (CLEMENTE et al., 2006). Adicionalmente, as ligações dissulfeto conferem um padrão simétrico ao inibidor, onde dois sítios reativos estão localizados em regiões opostas na molécula. Esses sítios podem ser utilizados simultaneamente, permitindo que o inibidor atue sobre duas proteases alvo ao mesmo tempo (Figura 11), sem mudança significativa da estrutura do inibidor. Os sítios reativos adotam uma conformação canônica que é similar ao substrato da protease (BODE et al., 2000) e ligações não-covalentes levam à inativação da protease após a interação da mesma com o inibidor (CLEMENTE et al., 2006).



**Figura 11.** Estrutura geral de um inibidor de protease da família Bowman-Birk. A) Destaque para as ligações dissulfeto (amarelo) e sítios reativos para tripsina (vermelho) e quimotripsina (verde) (número de depósito da estrutura no PDB: 2G81). B) Inibição simultânea de duas proteases por um inibidor Bowman-Birk (azul). Extraído de: <http://opm.phar.umich.edu/?images=all>.

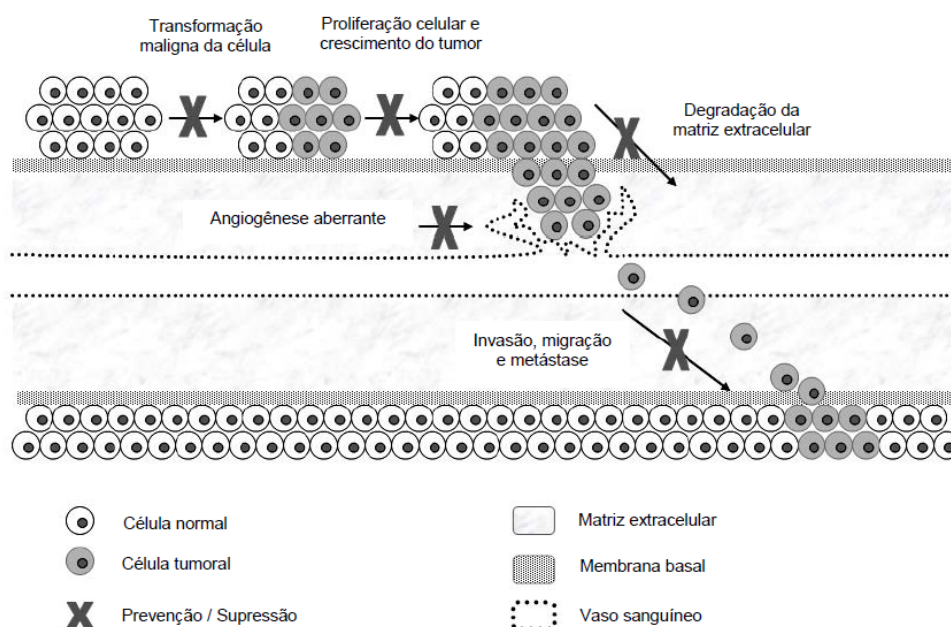
Um dos membros mais estudados dessa família encontra-se em sementes da soja (*Glycine max*). Ele apresenta massa molecular de aproximadamente 8 kDa e é formado por uma cadeia de 71 resíduos de aminoácidos com sete ligações dissulfeto (QI et al., 2005). Outros membros da família Bowman-Birk já foram purificados de diferentes leguminosas e caracterizados estrutural e funcionalmente. *Black-eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor* (BTCI) é um inibidor Bowman-Birk purificado de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) por VENTURA e XAVIER (1966). É uma proteína globular de cadeia única com 83 resíduos de aminoácidos (MORHY et al., 1987). Estudos relacionados à determinação de aspectos termodinâmicos e estruturais do BTCI vêm sendo realizados extensivamente (FACHETTI et al., 1984; FREITAS et al., 1997; FREITAS et al., 1999; SILVA et al., 2005; BARBOSA et al., 2007). É uma molécula que apresenta sete ligações dissulfeto e dois sítios reativos diferentes e independentes responsáveis pela inibição de quimotripsina e tripsina, respectivamente (XAVIER-FILHO et al., 1988) (Figura 12). Além disso, é considerado estável, mantendo sua atividade de inibição em temperaturas de até 95°C e em uma variação de pH de 3 a 11 (SILVA et al., 2000). O BTCI é estrutural e funcionalmente semelhante ao inibidor Bowman-Birk presente na soja (Figura 12). Segundo cálculos realizados em um servidor de análise de proteínas (SSAP Server, 2012), comparações da identidade de sequência de aminoácidos e da sobreposição estrutural entre BBI clássico e BTCI são de 75% e 95% respectivamente.



**Figura 12.** Estrutura do inibidor da família Bowman-Birk BTCI. A) Destaque para as ligações dissulfeto (amarelo) e sítios reativos para a tripsina (vermelho) e quimotripsina (verde) (PDB: 2G81). B) Sobreposição das estruturas do inibidor Bowman-Birk presente na soja (amarelo, PDB: 1BBI) e BTCI (azul): identidade da sequência de resíduos de aminoácidos e sobreposição estrutural de 75 e 95%, respectivamente (SSAP Server, 2012).



Os inibidores de protease estão relacionados a múltiplas aplicações potenciais em áreas econômicas e médicas (FEAR et al., 2007; PANDEY et al., 2007). Nas últimas décadas, a aplicação dos inibidores de protease tem sido estudada em contextos como a agricultura, doenças do sistema imune, infecções por microorganismos e vírus, hemostasia e câncer (JOANITTI et al., 2006). Esses inibidores são agentes potenciais para atuar em diversas etapas da carcinogênese, como na transformação maligna, na atividade proteolítica alterada, na angiogênese, no crescimento tumoral e na metástase (Figura 13) (JOANITTI et al., 2006).



**Figura 13.** Potenciais sítios de atuação dos inibidores de protease no processo de carcinogênese. Adaptado de JOANITTI et al., 2006.

### 1.7.1 Inibidores da família Bowman-Birk como agentes anticarcinogênicos preventivos

Agentes capazes de impedir ou reduzir a incidência de tumores em um sistema celular exposto a compostos indutores de câncer são considerados como preventivos, ou seja, atuam na prevenção contra o tumor. Dentre os alimentos citados como preventivos

contra o câncer destacam-se as leguminosas. Como dito anteriormente, populações orientais, que fazem um elevado consumo diário de leguminosas, apresentam baixas taxas de incidência de câncer quando comparadas a populações ocidentais com diferentes hábitos de alimentação (KENNEDY, 1998 a). Diversos experimentos mostraram que animais tratados com extratos de leguminosas apresentam significativa diminuição na incidência de tumores induzidos tanto por compostos químicos quanto por físicos (KENNEDY, 1998 a; KENNEDY, 1998 b). Por exemplo, camundongos que receberam uma alimentação a base de feijão ao longo de 1 ano apresentaram reduções de até 81% nas taxas de incidência de câncer de mama induzido pelo vírus *mouse mammary tumor virus* (MMTV) (FERNANDES et al., 1997).

Outros estudos mostram que compostos isolados de sementes de leguminosas também apresentam efeitos preventivos. Dentre as moléculas analisadas, os inibidores de protease Bowman-Birk destacam-se na prevenção significativa do câncer de cólon, esôfago, boca, pulmão, epidermóide, próstata, fígado e mama, tanto *in vitro* como *in vivo*, quando administrado em baixas concentrações na dieta dos animais (KENNEDY, 1998 a; KENNEDY et al., 2002).

O inibidor Bowman-Birk extraído de soja vêm sendo testado em ensaios clínicos na forma de BBIC (extrato contendo diferentes proteínas da soja) (KENNEDY, 1998 a). Em 1992, esse inibidor foi considerado um agente preventivo contra o câncer, de acordo com o órgão internacional *Food and Drug Administration* (FDA). Dentre os ensaios clínicos realizados na área de oncologia, destacam-se a avaliação da atividade anticarcinogênica preventiva do BBIC em pacientes com leucoplasia oral (lesão pré-maligna de câncer de boca). As duas primeiras fases do ensaio clínico realizado mostraram que o BBIC resultou na redução dose-dependente da lesão (ARMSTRONG et al., 2000). Quando em associação com outros tratamentos anticarcinogênicos, o inibidor Bowman-Birk da soja também pode atuar como agente protetor, reduzindo a transformação maligna induzida em células

normais expostas à radiação (DITTMANN et al., 2003). Além de prevenir a incidência de câncer, os inibidores Bowman-Birk não causam efeitos adversos mesmo quando administrados oralmente em altas doses (KENNEDY, 1998 a).

O mecanismo de ação desses inibidores ainda não foi elucidado, mas sabe-se que os mesmos são absorvidos pelo organismo após a ingestão e distribuem-se para vários órgãos e tecidos (BILLINGS et al., 1992). Adicionalmente, estudos têm indicado que inibidores de protease podem interromper o processo de transformação maligna, revertendo a expressão de proto-oncogenes (*c-myc*, *c-fos*) ou de proteínas com atividade proteolítica na célula tumoral (KENNEDY, 1998 a).

### **1.7.2 Inibidores da família Bowman-Birk como agentes anticarcinogênicos citostáticos e citotóxicos**

Agentes capazes de causar citotoxicidade, reduzir o volume tumoral e aumentar a expectativa de sobrevivência de um paciente são considerados como terapêuticos. Apenas recentemente os inibidores Bowman-Birk têm sido estudados como agentes anticarcinogênicos terapêuticos. Os estudos realizados *in vitro*, mostram que esses inibidores induzem efeitos citotóxicos e citostáticos em células tumorais de ovário, mama e próstata sem causar toxicidade em células normais (DITTMANN et al., 2003; SAITO et al., 2007; CLEMENTE et al., 2009; JOANITTI et al., 2010). Como alternativa aos tratamentos anticarcinogênicos convencionais, os inibidores Bowman-Birk apresentam efeito citotóxico significativo em células tumorais de ovário resistentes ao quimioterápico cisplatina (WAN et al., 1998). Em estudos *in vivo*, mostram potencial terapêutico desses inibidores em modelos de câncer de próstata, de cólon retal e de câncer de ovário, reduzindo tamanho dos tumores e incidências de metástases (WAN et al., 1999; SAKURAI et al., 2008; TANG et al., 2009). Outros estudos relataram que o inibidor Bowman-Birk de soja não induziu efeitos anticarcinogênicos quando incubado com células de câncer de mama que não apresentam o receptor de estrógeno (HSIEH et al., 2010). Investigações adicionais são necessárias para

determinar se o tipo de câncer e suas vias de sinalização específicas são determinantes para o efeito dos inibidores Bowman-Birk.

O exato mecanismo de ação desses inibidores como agentes anticarcinogênicos terapêuticos ainda estão sob investigação. No entanto, alguns alvos e efeitos já foram descritos, como: inibição de enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina; inibição da atividade proteolítica do proteassomo; indução de apoptose; aumento da expressão de conexina 43 funcional (proteína participante de junções comunicantes); permeabilização da membrana de lisossomos e bloqueio do ciclo celular (WAN et al., 1998; WAN et al., 1999; CHEN et al., 2005; LOSSO, 2008; SAITO et al., 2007; SOUZA, 2009; TANG et al., 2009; JOANITTI et al., 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

Extratos de sementes de leguminosas e inibidores de proteases da família Bowman-Birk são conhecidos pelos seus efeitos na prevenção e/ou retardo na incidência de câncer de diversas origens, dentre eles o câncer de pele (KENNEDY, 1998 a; KENNEDY, 1998 b; LOSSO, 2008). Dessa forma, o extrato bruto de sementes de *Vigna unguiculata* e o BTCI tem o potencial de atuar como agente anticarcinogênico na prevenção desse tipo de câncer.

Recentemente, as propriedades anticarcinogênicas do BTCI foram avaliadas em células de câncer de mama *in vitro*, induzindo efeitos citostáticos e citotóxicos significativos associados à apoptose e à permeabilização da membrana de lisossomos (JOANITTI et al., 2010). Adicionalmente, características como não afetar a viabilidade celular de células de mama normais favorecem seu uso como agente anticarcinogênico (JOANITTI, 2008; JOANITTI et al., 2010). O mecanismo de ação do BTCI ainda está sob investigação, mas sugere-se que sua atividade citotóxica esteja relacionada com a inibição de proteassomos (SOUZA, 2009). Análises anteriores mostraram que quando células de câncer de mama eram expostas a 200 µM BTCI por 72 horas, algumas moléculas eram internalizadas; no entanto, quantidades consideráveis de BTCI permaneciam na forma de agregados no meio de cultura (JOANITTI, 2008; SOUZA, 2009). A elevada quantidade de BTCI (200 µM) empregada em experimentos *in vitro* e a tendência de formar agregados (JOANITTI, 2008) poderia reduzir a aplicabilidade dessa proteína em tratamentos terapêuticos subseqüentes. O uso de sistemas nanoestruturados tem facilitado a entrega de macromoléculas, superando as barreiras existentes nos sistemas alvo

(TORCHILIN, 2007). Considerando a necessidade de reduzir a quantidade de BTCI e prevenir a agregação dessa molécula, sem alterar os efeitos anticarcinogênicos e, principalmente, que o BTCI atinja alvos intracelulares, sistemas nanoestruturados foram escolhidos para os estudos aqui apresentados.

Portanto, no presente trabalho propomos expandir e continuar os estudos que, pela primeira vez, avaliaram os efeitos do inibidor BTCI na área de oncologia (JOANITTI, 2008; SOUZA, 2009; JOANITTI et al., 2010), utilizando-se como modelo experimental células de câncer de mama e de pele, consideradas neoplasias malignas freqüentes e agressivas no Brasil e no mundo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de extrato de sementes de *Vigna unguiculata* e do inibidor de proteases BTCI, livre e encapsulado em nanopartículas, em células de câncer de mama e na prevenção de câncer de pele.

#### 3.2 Objetivos específicos

- \* Avaliar os efeitos de extrato de sementes de *V. unguiculata* e do BTCI na incidência e no volume de lesões pré-malignas de câncer de pele não-melanoma, *in vivo*.
- \* Analisar a frequência de alterações histopatológicas e a produção de marcadores da progressão de lesões pré-malignas de câncer de pele não-melanoma, após o tratamento com extrato de sementes *V. unguiculata* ou do BTCI, *in vivo*.
- \* Comparar os efeitos do extrato de sementes *V. unguiculata* e do BTCI na prevenção de lesões pré-malignas de câncer de pele não-melanoma, *in vivo*.
- \* Determinar a influência da composição e dos métodos de preparação de nanoestruturas (micelas ou lipossomos) na agregação, estabilidade e eficiência de encapsulação do BTCI.
- \* Analisar o efeito de modificações na superfície de nanoestruturas encapsulando BTCI na internalização e citotoxicidade em células de câncer de mama, *in vitro*.
- \* Comparar o grau de pureza de diferentes amostras de BTCI livre com a citotoxicidade em células de câncer de mama, *in vitro*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS

**Tabela 1.** Equipamentos, materiais e reagentes utilizados.

<b>Equipamentos</b>	<b>Fabricante</b>
Balança Analítica Modelo AA-200	Denver Instrument Company, EUA
Câmara de Neubauer	C. A. Hausser & Son, EUA
Câmara digital	Zeiss, ALE
Centrífuga Himac CR 21	Hitachi Koki Co., JAP
Centrífuga Mikro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, ALE
Citômetro de fluxo (FACSCallibur)	Becton & Dickenson, EUA
Confocal LSM Meta 510	Zeiss, ALE
Espetrofotômetro Modelo V-530 J	ASCO, JAP
Estufa	Tecnal, BRA
Extrusor	Avanti Polar Lipids, EUA
Fluxo Laminar	Veco, BRA
Homogeneizador de Tecido, Homomix	Biosystems, EUA
HPLC	Hitachi, JAP
HPLC	Shimadzu, JAP
Leitora de Microplaca	Biotek, EUA
Liquidificador	Metalurgia SIEMSEN, BRA
MALDI-TOF/MS UltraFlex III	Bruker Daltonics, ALE
Microscópio de luz invertido	Unico, EUA
Micrótomo	Leica, ALE
Paquímetro	Starret, BRA
pHâmetro Accumet Basic AB 15	Fisher Scientific, EUA
Rotaevaporador	LabConco, EUA
Sonicador Sonifier 450	Branson, EUA
Zeta Plus	BrookHaven , EUA



<b>Materiais</b>	<b>Fabricante</b>
Balão para rotavoparação Kimble / Kontes	Fisher Scientific, EUA
Coluna cromatográfica (3,5 × 23 cm)	BioRad, EUA
Coluna de HPLC KW804	Shodex, ALE
Coluna de HPLC C18	Hitachi, JAP
Coluna de HPLC C4 300Å	NST, BRA
Criotubos	TPP, ALE
Cubeta de plástico	LaboLan, ESP
Frascos de Cultura	TPP, ALE
Gel de poliacrilamida 16%	Expedeon, EUA
Lâmina de vidro fosco	Perfecta, BRA
Lâminas de SilicaGel para cromatografia em camada delgada	Sigma, EUA
Lamínula	Perfecta, BRA
Lente ocular micrométrica	Zeiss, EUA
Membrana de diálise com limite de exclusão de 300 kDa	Spectrum, EUA
Membranas com poros de 0,22 µm	TPP, ALE
Membranas de diálise	Spectrum Laboratories, EUA
Membranas de policarbonato (poros de 200 nm)	Avanti Polar Lipids, EUA
Microcon MWCO 100 kDa	Millipore, EUA
Papel filtro	J Prolab, BRA
Papel indicador de pH	Whatman, ALE
Placas de 96 poços	TPP, ALE
Placas de cromatografia em camada delgada	Sigma-Aldrich Co., EUA
Placas de cultura de células	TPP, ALE
Tubos Falcon de 15 e 50 mL	TPP, ALE

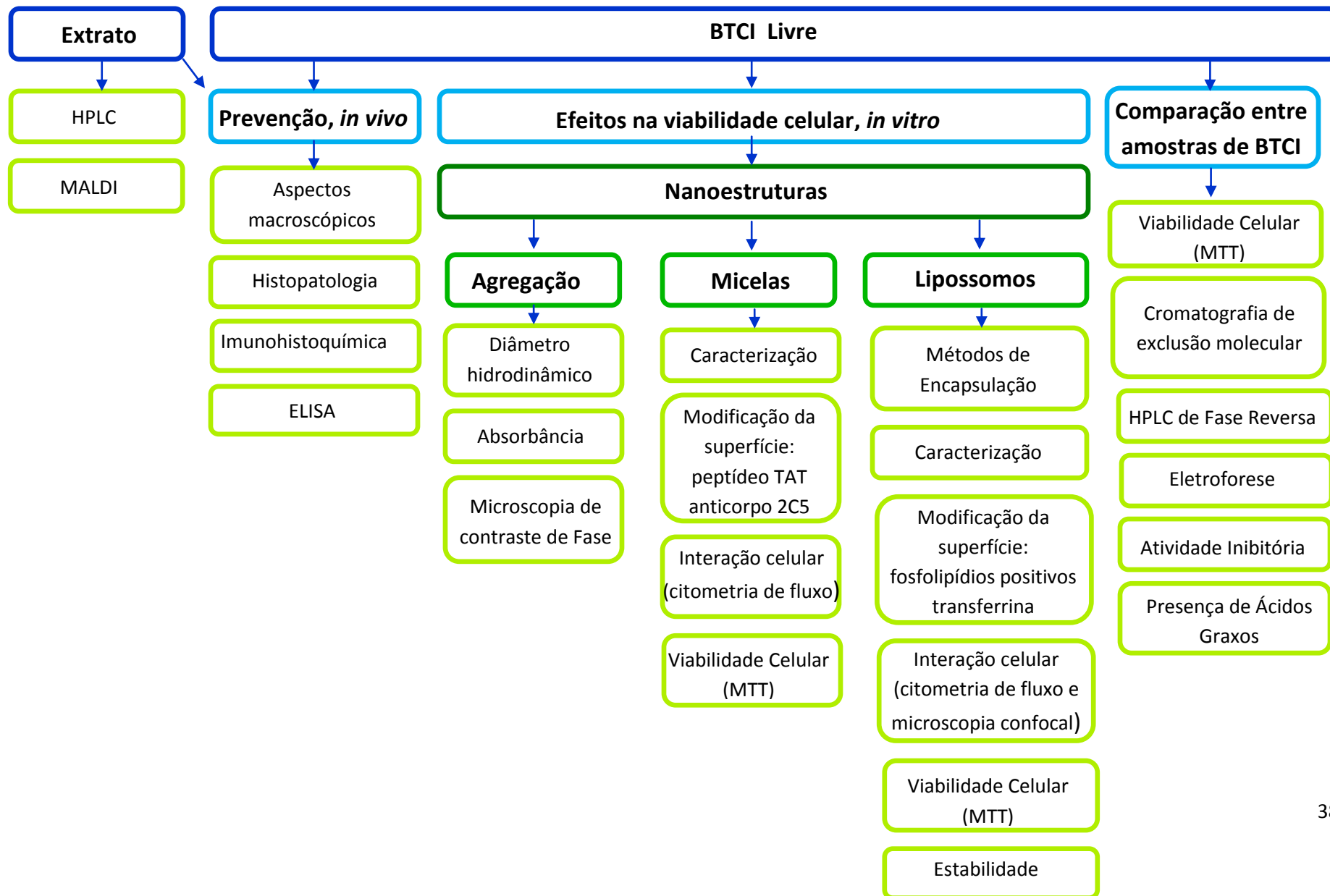
<b>Reagentes / kits</b>	<b>Fabricante</b>
Acetona	Fisher, EUA
Acetonitrila	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ácido acético	Vetec Quimica Fina Ltda, BRA
Ácido Clorídrico	Vetec Quimica Fina Ltda, BRA
Ácido fosfomolibdico	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ácido tricloroacético (TCA)	Vetec Quimica Fina Ltda, BRA
Ácido trifluoroacético (TFA)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Ácido α-cyano-4-hidroxi- cinamico	Bruker Daltonics, ALE
Albumina Serica Bovina (BSA)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Anestésico Quetamina	Synteh, EUA
Anestésico xilazina	Bayer, EUA
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Anticorpo 2C5	Harlan Bioproducts (Indiannapolis, IL)
Anticorpo anti-mouse IgG conjugado ao fluoróforo AlexaFluor 488	Invitrogen, EUA
Anticorpo primário anti-LAMP2	Abcam, EUA
Anticorpo primário contra COX-2 (camundongo)	Abcam, EUA
Anticorpo primário contra Ki-67 (camundongo)	Abcam, EUA

Anticorpo primário contra PGE2 (camundongo)	Abcam, EUA
Anticorpo primário IgG	Abcam, EUA
Anticorpo Rabbit Immunoglobulin Biotinylated	Dako, EUA
Anticorpo secundário goat anti-mouse IgG peroxidase	Abcam, EUA
Azul Tripán	Sigma-Aldrich Co., EUA
BAPNA : N $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride	Sigma-Aldrich Co., EUA
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Biotinylated link Universal Streptavidin-HRP	Dako, EUA
Carbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Caseína	Sigma-Aldrich Co., EUA
CHAPS	Sigma-Aldrich Co., EUA
Citrato de Sódio	Invitrogen, EUA
Cloreto de Cálcio	J. T. BAKER, EUA
Cloreto de Ferro	Sigma-Aldrich Co., EUA
Cloreto de Sódio	J. T. BAKER, EUA
Clorofórmio	Fisher, EUA
Colesterol	Sigma-Aldrich Co., USA
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Applied Science, EUA
DEAE-celulose	Sigma-Aldrich Co., USA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich Co., EUA
DMBA	Sigma-Aldrich Co., USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Gibco, USA
DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine )	Avanti Polar Lipids, EUA
DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane)	Avanti Polar Lipids, EUA
DTT	Sigma-Aldrich Co., EUA
EDTA	Fisher, EUA
Eosina	Lafan Química Fina, BRA
Éter isopropílico	Fisher, EUA
Fluoromount-G	SouthernBiotech, EUA
Fosfato de Potássio Monobásico	Sigma-Aldrich Co., USA
GPNA: N - glutaryl - L - phenylalanine - p -nitroanilide	Sigma-Aldrich Co., EUA
Hematoxilina	Lafan Química Fina, BRA
Hematoxilina de Mayer	Lafan Química Fina, BRA
Hidróxido de Sódio	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Kit cromógeno DAB	Dako, Usa
Kit de Bradford	Fisher, EUA
Kit para detecção ácidos graxos	BioVision, EUA
Kit Phospholipid C	Wako, EUA
<i>Kit Silver Stain Plus</i>	Bio-Rad, EUA
Leite em pó desnatado Mollico	Nestlé, SUI
Marcador para eletroforese (PageRuler Unstained Protein Ladder )	Fisher, EUA
Metanol	Fisher, EUA
MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	Invitrogen, EUA
NHS-PEG <sub>1000</sub> -maleimide	Avanti Polar Lipids, EUA
NHS-Rodamine	Thermo Scientific, EUA

Nucleohistonas	Worthington Biochemical, EUA
Padrão para Gel filtração	BioRad, EUA
Paraformaldeído	Vetec Quimica Fina Ltda, BRA
Paraplast	Merck, ALE
PC (fosfatidilcolina de ovo)	Avanti Polar Lipids, EUA
PEG-PE: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]	Avanti Polar Lipids, EUA
Peróxido de Hidrogênio	Fisher, EUA
PMSF	Roche Applied Science, EUA
pNP-PEG <sub>3400</sub> -pNP	Laysan Bio, Inc, EUA
Poli-L-lisina	Sigma-Aldrich Co., EUA
Quimotripsina (alpha)	Sigma-Aldrich Co., EUA
Reagente de Dragendorff	Sigma-Aldrich Co., EUA
Rodamina-PE	Avanti Polar Lipids, EUA
Sacarose	J. T. BAKER, EUA
SDS	Fisher, EUA
Sepharose CL-4B	Sigma-Aldrich Co., EUA
Solução de Folin	Sigma-Aldrich Co., EUA
Soro Fetal Bovino	Gibco, USA
Substrato TMB	Fisher, EUA
Sulfato de amônio	Sigma-Aldrich Co., USA
Sulfato de cobre	Sigma-Aldrich Co., EUA
Tampão de amostra e de corrida para eletroforese	Expedeon, EUA
Tampão fosfato-salina (PBS)	Laborclin, BRA
Tartarato de sódio e potássio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Tiocianato de Amônio	Sigma-Aldrich Co., EUA
TPA	Sigma-Aldrich Co., USA
Transferrina humana	Sigma-Aldrich Co., EUA
Trietilamina	Sigma-Aldrich Co., EUA
Tripsina	Sigma-Aldrich Co., EUA
Tripsina-EDTA (0,25 e 0,02 % )	Gibco, USA
Tris	Merck, ALE
Triton X-100	Merck, ALE
Tween 20	Sigma-Aldrich Co., EUA
Verniz vitral	Acrilex, BRA
Xileno	Vetec Quimica Fina Ltda, BRA

---

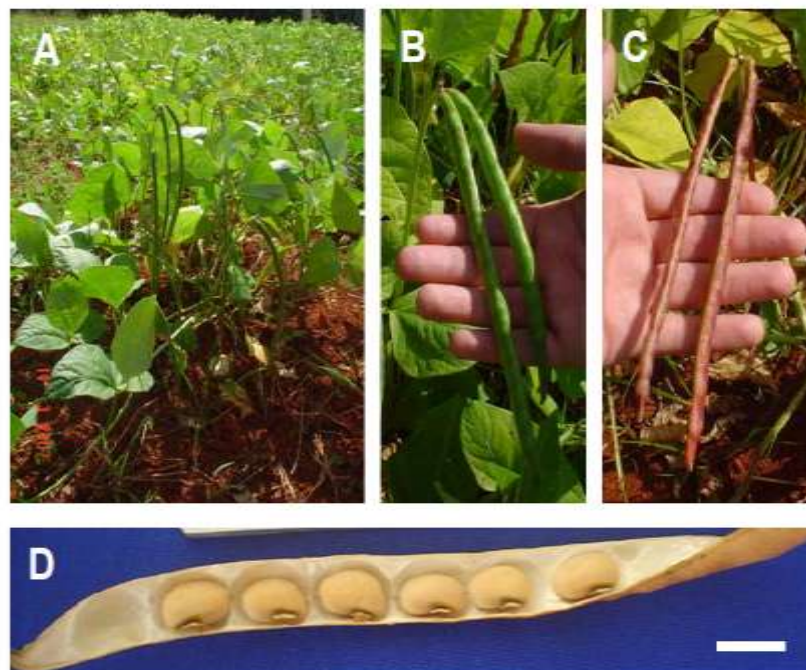
## 4.2 DESENHO EXPERIMENTAL



## 4.3 PRODUÇÃO DE EXTRATO E PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEASE BTCl

### 4.3.1 Obtenção de sementes de *Vigna unguiculata*

Matrizes de sementes de *Vigna unguiculata* (variedade Seridó), conhecidas como feijão-de-corda, foram obtidas do banco de sementes mantido pelo Departamento de Bioquímica da Universidade de Fortaleza. Parte das sementes foi estocada a 4°C e a outra parte foi plantada na Estação de Biologia Experimental da Universidade de Brasília. Em aproximadamente três meses após o plantio, as sementes já estavam completamente desenvolvidas e prontas para serem usadas na produção do extrato e purificação de BTCl (Figura 14).



**Figura 14.** *Vigna unguiculata*. A) Plantação na Estação Biológica da Universidade de Brasília. B) Vagem jovem. C) Vagem madura. D) Sementes maduras. Barra = 1 cm.

### 4.3.2 Preparação de extrato de sementes

A obtenção do extrato das sementes de *V. unguiculata* foi realizada segundo metodologia descrita por VENTURA e colaboradores (1966). As sementes coletadas foram secas à temperatura ambiente e submetidas a trituração até a formação de um pó. Quinhentos gramas desse pó foram misturados em 2 litros de água destilada e 200 µL de PMSF 200 mM. Essa mistura foi mantida a 4°C sob agitação constante por 12 horas. Em seguida, a mistura foi novamente homogeneizada em um liquidificador por 15 minutos, filtrada em tecido de algodão e centrifugada a 7000 g por 30 minutos a 4°C. O material retido no tecido de algodão foi novamente homogeneizado em liquidificador por 15 minutos com mais 500 mL de água destilada e, em seguida, filtrado e centrifugado na mesma condição descrita anteriormente.

Os sobrenadantes foram reunidos e submetidos a uma precipitação com ácido tricloroacético (TCA) na concentração final de 2,5% (v/v). O TCA foi adicionado lentamente ao sobrenadante, o qual foi mantido sob agitação constante por 1 hora a 4°C. Em seguida, essa mistura foi filtrada em papel filtro e submetida a precipitação com sulfato de amônio, na forma sólida, até a saturação de 50%. Após 1 hora de agitação, o material resultante foi centrifugado a 7000 g por 40 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* totalmente dissolvido em aproximadamente 25 mL de água destilada e dialisado contra água destilada por 12 horas. Após a diálise, o extrato final foi liofilizado e armazenado a - 30°C até o momento do uso.

#### **4.3.3 Análise do conteúdo protéico do extrato por HPLC de fase reversa**

O extrato foi diluído em água deionizada com 0,1% (v/v) de TFA e aplicado em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). Foi utilizada uma coluna semi-preparativa C4300A C4 (10 x 250 mm, 5 µm), a qual foi inicialmente lavada com solução de TFA em acetonitrila a 0,1% (v/v) (solvente B) e, posteriormente, equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (v/v) (solvente A). O gradiente utilizado foi linear, variando-se a concentração do solvente B de 5 a 60% durante 45 minutos. O fluxo durante a eluição foi de 3 mL/min, com monitoramento a 216 nm e 280 nm, sendo as separações cromatográficas conduzidas à temperatura ambiente.

#### **4.3.4 Purificação do BTCl por cromatografia de troca iônica**

A purificação de BTCl a partir do extrato foi realizada segundo a metodologia descrita por VENTURA e colaboradores (1966). A purificação foi realizada em coluna cromatográfica (3,5 x 23 cm) preenchida com DEAE-celulose e ativada pelo seguinte processo: adição de 250 mL de HCl 200 mM; 300 mL de água destilada; seguida de 250 mL de NaOH 200 mM; 300 mL de água; seguida de 30 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,3) e 300 mL de tampão de equilíbrio (fosfato de potássio 10 mM, pH 7,3). Trezentos miligramas de extrato foram diluídos em 10 mL de tampão de equilíbrio e centrifugados por 10 minutos a 10000 g. Após a aplicação do sobrenadante, a coluna foi lavada com 300 mL do tampão de equilíbrio. A eluição de BTCl foi realizada aplicando um gradiente linear de 500 mL de NaCl variando de 0 a 800 mM (fluxo de 3 mL/minuto). Após desprezar os primeiros 150 mL, o material eluído foi coletado em frações de 3 mL e monitorado quanto a presença de proteínas, pela leitura de absorvância em 280 nm. As frações

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

#### 4.3.5 Análise da pureza por espectrometria de massa MALDI-TOF/MS

As massas moleculares das frações do extrato e a pureza do BTCl foram determinadas por espectrometria de massa. As amostras foram dissolvidas em água deionizada e diluídas (na proporção de 1:3, v/v) em uma solução de matriz saturada de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxycinâmico (5 mg de ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxycinâmico, 200  $\mu$ L de água nanopura, 250  $\mu$ L de acetonitrila e 50  $\mu$ L de TFA). Em seguida, 0,5  $\mu$ L da mistura de amostra e matriz foram depositados em uma placa de MTP AnchorChip 600/384. Os espectros foram obtidos com aplicação de laser de frequência de 50 Hz em modo linear positivo, após a calibração externa do equipamento. Posteriormente, os dados foram analisados pelo programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, ALE).

#### 4.3.6 Determinação da concentração de BTCl e extrato em solução

A concentração do BTCl purificado (item 4.3.4) foi determinado a partir da solução de BTCl diluído em água nanopura e leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 280 nm. A absorbância obtida foi empregada na seguinte fórmula:

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

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

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



A concentração extrato em solução foi determinada por cálculo incluindo a quantidade de material pesado em balança analítica e o volume de solução aquosa adicionado.

#### **4.4 TRATAMENTO PREVENTIVO COM BTCI E EXTRATO DE SEMENTES CONTRA CÂNCER DE PELE NÃO-MELANOMA, *IN VIVO*.**

##### **4.4.1 Indução química de câncer de pele não-melanoma e tratamento**

O protocolo de indução de câncer utilizado nesse estudo foi baseado em metodologias previamente descritas (BEIGNON et al., 2001; FENG et al., 2002; MEERAN et al., 2009; FILLER et al., 2010). Camundongos Balb/c fêmeas foram isolados em biotério a 25°C, com ciclo claro/ escuro 12 h/12 h, e receberam água e ração *ad libitum*. Eles foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com seis animais cada. Foram utilizados animais com 4 meses de idade, uma vez que animais nessa idade tem maior propensão ao desenvolvimento de câncer de pele (FENG et al., 2002).

Após anestesia (20 µL de quetamina 10% e 12 µL de xilazina 2%; i.p.), os animais tiveram uma área de 4 x 3 cm do dorso depilado uma semana antes da indução do câncer. O reagente DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) diluído em acetona foi utilizado como o agente indutor. Uma dose única de 100 µL da suspensão de DMBA (400 nM) foi espalhada homoganeamente no dorso dos animais com o auxílio de um pincel.

Após uma semana, o dorso dos animais foi umedecido por 2 minutos com uma gaze hidratada com água (BEIGNON et al., 2001). Em seguida, 200 µL de BTCI ou extrato (Tabela 2) foram aplicados no dorso dos animais com o auxílio de um

pincel. Duas a três horas após o tratamento com as proteínas, os animais receberam a aplicação do reagente promotor do câncer: TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) diluído em acetona. Cem microlitros de TPA (40 nM) foram espalhados homogeneamente no dorso com o auxílio de um pincel. As aplicações das proteínas e do TPA foram repetidas por 15 semanas em um regime de 2 aplicações por semana. Durante o período de tratamento, as dimensões das lesões pré-malignas foram medidas 2 vezes por semana com o auxílio de um paquímetro e o volume foi calculado pela fórmula:  $0,5 \times altura \times largura \times comprimento$  (TOMAYKO et al., 1989).

Devido à toxicidade dos reagentes DMBA e TPA utilizados nesse protocolo, todos os procedimentos foram realizados em capela de exaustão com equipamentos de proteção individual como: respiradores com filtros químicos, jalecos descartáveis, toucas descartáveis, luvas de nitrilo e óculos. Todos os materiais que entraram em contato com os reagentes tóxicos foram incinerados, de acordo com as normas de biossegurança da Universidade de Brasília.

**Tabela 2.** Concentrações de BTCl e extrato aplicadas no dorso de camundongos para a prevenção de câncer de pele. As aplicações foram feitas 2 vezes/semana por 15 semanas.

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Dose</b>
Controle	6	200 µL de água deionizada
BTCl	6	1mg / 200 µL de água deionizada
Extrato	6	1 mg /200 µL de água deionizada

Após 15 semanas, os animais foram mortos por deslocamento cervical e tiveram a pele removida. Para cada animal, a pele coletada foi seccionada ao meio sendo que uma parte foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido para

procedimento de ELISA e a outra parte foi fixada em paraformaldeído 4% (diluído em PBS; pH 7,4) por 2 horas a temperatura ambiente para análises histológicas e imunohistoquímica.

#### **4.4.2 Análise histológica e imunohistoquímica**

Após a fixação, as amostras de pele foram processadas com protocolo padrão para microscopia de luz: desidratações em concentrações crescentes de etanol (70 a 100%, v/v) por 40 minutos; diafanização em 3 banhos de xileno por 30 minutos cada; e infiltração em 3 banhos em resina de paraplast (1 hora cada) seguida de emblocamento na mesma resina. Para cada animal, a pele emblocada foi completamente seccionada em micrótomo de modo seriado, sendo que uma secção histológica de 5 µm foi coletada a cada 50 µm.

Parte das lâminas contendo as secções coletadas foi corada com hematoxilina e eosina (HE) seguindo protocolo padrão: 3 banhos em xileno por 1 minuto cada; hidratação em concentrações decrescentes de etanol (100 a 70%, v/v) por 1 minuto cada; coloração com eosina 1% (p/v) e hematoxilina 1% (p/v) por 30 segundos e 1 minuto respectivamente; desidratações em concentrações crescentes de etanol (70 a 100%, v/v); 3 banhos em xileno (1 minuto cada). As secções foram cobertas com algumas gotas de verniz vitral, seguido do posicionamento de uma lamínula sobre o verniz. Características histopatológicas foram registradas após análise de todas as lâminas em microscópio de luz. Imagens representativas de cada grupo foram digitalizadas por sistema de aquisição de imagens acoplado ao microscópio.

A outra parte das lâminas contendo as secções coletadas foi submetida à marcação imunohistoquímica para os marcadores Ki-67 (proliferação celular),

Ciclooxigenase-2 (COX-2; inflamação) e prostaglandina E2 (PGE2; inflamação). As secções de tecidos tumorais foram desparafinizadas em xileno e hidratadas em água destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada com solução de 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol por 17 minutos. A recuperação dos sítios antigênicos foi feita em tampão citrato (0,21 g/L; pH 6,02) em uma panela de pressão por 90 segundos (contados após a panela atingir a pressão máxima). As lâminas foram resfriadas e incubadas com 3% leite de pó desnatado em PBS (p/v) por 30 minutos. Os anticorpos primários contra Ki-67, COX-2 e PGE2 foram diluídos na proporção de 1:100 (v/v) em 1% leite em pó desnatado em PBS (p/v) e incubados separadamente com as lâminas por 12 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução de 0,1% albumina sérica bovina (BSA) em PBS por 30 minutos (3 trocas de 10 minutos cada) e incubadas com o anticorpo secundário na proporção de 1:100 (v/v) por 17 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com o agente intensificador da marcação (*rabbit immunoglobulin biotinylated*) por 20 minutos e lavadas novamente em PBS. A marcação nas lâminas foi revelada com o kit *DAB Chromogen* por 10 minutos e contra coradas com hematoxilina de Mayer por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram desidratadas, montadas com lamínulas (como descrito no parágrafo acima) e examinadas em microscópio de luz. O número de células marcadas positivamente foi contado com o uso de uma lente ocular micrométrica, em 10 campos aleatórios localizados nas regiões das lesões pré-malignas e em áreas em torno da mesma. Os resultados foram expressos como a média do número de células marcadas positivamente  $\pm$  erro padrão de n observações por mm<sup>2</sup> (SÁ et al., 2007).

#### 4.4.3 Detecção de COX-2 e PGE2 por ELISA

As amostras de pele previamente congeladas em nitrogênio líquido foram pesadas, seccionadas em partes menores e homogeneizadas em gelo com tampão homogenato (sacarose 300 mM; EDTA 100 mM; Triton X-100 0,3%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M; Tris 20 mM; coquetel de inibidores de protease; pH 7,4), na proporção de 300  $\mu\text{L}$  de tampão para cada 5 mg de tecido, com o auxílio de um homogeneizador de tecidos elétrico. Os homogenatos foram centrifugados por 20 minutos a 10000 g a 4°C e os sobrenadantes foram submetidos à dosagem da concentração de proteínas pelo método de Bradford.

As proteínas dos sobrenadantes foram diluídas para concentração final de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão de cobertura (3,03 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 6,0 g  $\text{NaHCO}_3$ ; água deionizada q.s.p. 1000 mL; pH 9,6), pipetadas em triplicata em placa de 96 poços (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) e incubadas por 12 horas a 4°C. Os poços foram lavados 3 vezes em solução de lavagem (PBS acrescido de Tween-20 0,05%) e a peroxidase endógena foi bloqueada com solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3% em metanol por 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% (v/v) leite desnatado em PBS por 1 hora. Os anticorpos primários contra COX-2 e PGE2 foram diluídos em 1% (v/v) de leite desnatado em PBS na proporção de 1:10000 e incubados separadamente com as amostras por 12 horas a 4°C. Após 7 lavagens, os poços foram incubados com o anticorpo secundário diluído em 1% (v/v) de leite desnatado em PBS, na proporção de 1:10000 por 1 hora a temperatura ambiente, e submetidos a mais 7 lavagens. A marcação foi revelada com a adição do substrato TMB por 1 hora e interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M. Os poços foram lidos em comprimento de onda de 450 nm.

## 4.5 ENCAPSULAÇÃO DE BTCI EM NANOESTRUTURAS

### 4.5.1 Detecção de agregados de proteína

A presença de agregados nas amostras de BTCI diluídas em soluções aquosas foi determinada por três métodos diferentes:

a) Espalhamento de luz dinâmico: é uma técnica utilizada para medir o diâmetro hidrodinâmico e a polidispersividade de partículas em suspensão e analisar a organização estrutural de proteínas nos estados oligoméricos e de agregação. Cada solução de BTCI foi transferida para uma cubeta de plástico que, posteriormente, foi inserida no equipamento Zeta Plus para a realização da leitura à temperatura ambiente. Os dados obtidos foram calculados pelo software Zeta Plus a partir da relação entre o sinal da intensidade da luz espalhada e a porcentagem de massa da amostra em solução.

b) Espectrofotometria: o aumento na absorbância de uma solução de proteínas indica a formação de agregados (ZHANG et al., 2009). Amostras de BTCI (200 µL) foram transferidas para uma placa de 96 poços e as absorbâncias foram lidas a 600 nm. Soluções aquosas sem a adição de BTCI foram utilizadas como referência.

c) Microscopia de contraste de fase: a presença de agregados de dimensões iguais ou maiores que 200 nm podem ser observados por microscopia de contraste de fase. Amostras de BTCI (200 µL) foram transferidas para uma placa de 96 poços e observadas em diferentes aumentos em microscópio de contraste de fase.

#### 4.5.2 Encapsulação do BTCl em micelas de PEG-PE

Alíquotas de PEG-PE (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)], com massa molecular da cadeia de PEG variando de 750 a 5000 Da, foram retiradas de solução estoque em clorofórmio, transferidas para um balão e evaporadas em rotaevaporador até a formação de um filme lipídico homogêneo. Para remover resquícios de clorofórmio, o filme lipídico foi submetido à liofilização por 2 horas. Para a obtenção de micelas, o filme lipídico foi hidratado com PBS (pH 7,4) e agitado em vortex até a total dissolução do mesmo. BTCl foi diluído em solução de PEG-PE em diferentes concentrações, agitado em vórtex e mantido a temperatura ambiente por 2 horas.

#### 4.5.3 Encapsulação do BTCl em micelas de PEG-PE carregadas positivamente

Micelas de PEG<sub>750</sub>-PE carregadas positivamente foram obtidas com a adição do peptídeo TAT à sua superfície. O peptídeo TAT-Cys (Cys-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg; massa molecular de 1663 Da) foi sintetizado e purificado pela *Tufts University Core Facility* (Boston, EUA). TAT-Cys foi conjugado à moléculas de PEG-<sub>1000</sub>-PE como descrito a seguir. Aproximadamente, um excesso de 1,5 vezes (razão molar) de NHS-PEG<sub>1000</sub>-maleimide foi adicionado ao fosfolipídio DOPE em clorofórmio e agitados a temperatura ambiente por 2 horas com um excesso de 3 vezes (razão molar) de trietilamina. Um excesso de 2 vezes (razão molar) de TAT-Cys foi adicionado e a suspensão ficou sob agitação por mais 1 hora. O clorofórmio foi posteriormente evaporado em rotaevaporador e liofilizado. O filme lipídico foi hidratado com HCl 1 mM, e a separação de TAT-Cys não conjugado foi feita por cromatografia de exclusão molecular em coluna (25 x 500 mm) com resina Sepharose CL-4B e fluxo de 0,5 mL/min. As frações coletadas foram monitoradas

por cromatografia em camada delgada (fase móvel de clorofórmio/metanol, 80:20% v/v) e visualizadas com reagente de Dragendorff (para detecção de PEG) ou ácido fosfomolibdico (para detecção de lipídios). Para confirmar a conjugação de PEG-<sub>1000</sub>-PE com TAT-Cys, as amostras foram analisadas por HPLC de fase reversa em coluna C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) com fluxo de 1 mL/minuto e gradiente linear de acetonitrila variando de 5 a 95% por 30 minutos. As frações contendo o conjugado de interesse foram liofilizadas, dissolvidas em clorofórmio para a concentração de 2 mg/mL e estocadas a - 80°C. Micelas carregadas positivamente foram então formuladas na proporção PEG<sub>750</sub>-PE / TAT-PEG<sub>1000</sub>-PE 97,5 : 2,5% (razão molar) e preparadas como descrito no item 4.5.2.

#### **4.5.4 Encapsulação do BTCl em imunomicelas de PEG-PE**

Imunomicelas de PEG<sub>2000</sub>-PE foram obtidas com a adição do anticorpo monoclonal 2C5 à sua superfície. Ele é capaz de reconhecer nucleossomos associados à membrana de células tumorais de diversas origens, dentre elas MCF-7 e 4T1 (ELBAYOUMI et al., 2007). A produção e purificação do anticorpo foram realizadas pela empresa *Harlan Bioproducts* (Indiannapolis, EUA). O anticorpo 2C5 foi conjugado ao copolímero pNP-PEG<sub>3400</sub>-PE como descrito a seguir. Primeiramente, pNP-PEG<sub>3400</sub>-PE foi sintetizado. Um excesso de 10 vezes (razão molar) de pNP-PEG<sub>3400</sub>-pNP foi adicionado à moléculas de DOPE em clorofórmio na presença de um excesso de 3 vezes (razão molar) de trietilamina por 12 horas a temperatura ambiente. Clorofórmio foi posteriormente evaporado em rotaevaporador e liofilizado. O filme lipídico foi hidratado com HCl 1 mM, e a separação de pNP-PEG<sub>3400</sub>-pNP não conjugado foi feita por cromatografia de exclusão molecular em coluna (25 x 500 mm) com resina Sepharose CL-4B (Sigma, EUA) e fluxo de 0,5



mL/min. As frações coletadas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (fase móvel de clorofórmio/metanol, 80:20% v/v) e visualizadas com reagente de Dragendorff (para detecção de PEG) ou ácido fosfomolibdico (para detecção de lipídios). As frações contendo o conjugado de interesse foram liofilizadas, dissolvidas em clorofórmio para a concentração de 2 mg/mL e estocadas a - 80°C.

Em seguida, após a formação de um filme lipídico, pNP-PEG<sub>3400</sub>-PE foi hidratado para a concentração de 10 mg/mL com solução de 5 mM citrato de sódio, 150 mM NaCl, pH 5. As micelas de pNP-PEG<sub>3400</sub>-PE foram então adicionadas a um mesmo volume de solução de 2C5 ou IgG (1mg/mL) em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 100 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8 mM, pH 9). A mistura foi incubada por 24 horas a 4°C sob agitação. A mistura foi adicionada à solução de PEG<sub>2000</sub>-PE em PBS (pH 7,4), na proporção de PEG<sub>2000</sub>-PE / 2C5-PEG<sub>3400</sub>-PE 95 : 5% (razão molar) e incubada por 24 horas a 4°C sob agitação. O excesso de 2C5 não conjugado foi removido por diálise em membrana com limite de exclusão de 300 kDa por 12 horas a 4°C.

A atividade imunológica do anticorpo 2C5 na superfície das micelas foi avaliada por ELISA. O fundo de placas de 96 poços foram recobertas com 50 µL de solução de poli-L-lisina (40 µg/mL), preparada em TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), por 1 hora a 4°C. O excesso de poli-L-lisina foi descartado e 200 µL de TBST-Cas (TBS, Tween-20 0,05%, caseína 2 mg/mL) foram adicionados por 1 hora para prevenir ligações inespecíficas. Os poços foram lavados três vezes com TBST e 50 µL de nucleohistonas (40 µg/mL), preparados em TBST-Cas, foram incubados por 1 hora. Os poços foram lavados três vezes com TBST, e 50 µL de 2C5-micelas a 5 µg/mL, preparadas em TBST-Cas, foram adicionados em cada poço em diluição

seriada e incubados por 1 hora. Após cinco lavagens com TBST, o anticorpo secundário *anti-mouse IgG peroxidase*, diluído em TBST-Cas na proporção de 1:5000, foi adicionado aos poços e incubado por 1 hora. Os poços foram lavados 7 vezes com TBST, e a marcação foi revelada com a adição do substrato TMB por 15 minutos e lida em comprimento de onda de 620 nm.

#### **4.5.5 Encapsulação do BTCl em lipossomos**

Alíquotas de estoque de lipídios em clorofórmio foram transferidas em proporções variadas para um balão volumétrico e submetidos, independentemente, à 5 métodos de preparação diferentes. Diferentes proporções e combinações dos lipídios fosfatidilcolina de ovo, colesterol e DOTAP (fosfolipídio catiônico) foram utilizados.

##### **4.5.5.1 Método de hidratação do filme lipídico (HFL)**

Esse método consiste na dispersão dos lipídios em um solvente orgânico, o qual posteriormente é evaporado até a formação de um filme lipídico. Ao serem hidratados com solução aquosa contendo a proteína a ser encapsulada, os lipídios se auto-organizam e formam vesículas multilamelares heterogêneas (VMLs), da ordem de micrômetros, envolvendo parte do solvente adicionado entre as lamelas e em sua região central (SZOKA et al., 1980; GREGORIADIS, 2006). Para reduzir o tamanho dessas vesículas de micrômetros (multilamelares) para nanômetros (unilamelares na faixa de 100 a 500 nm), elas podem ser submetidas ao processo de extrusão, o qual consiste na passagem dessas partículas por membranas com poros de tamanhos definidos, resultando em uma população homogênea de vesículas unilamelares. Alternativamente, a redução do tamanho de MVLs pode ser

feita pelo método de sonicação, que consiste na mistura de uma suspensão lipídica submetida a tratamento com ultra-som. A pressão induzida pelo equipamento é suficiente para romper as MVLs resultando na formação de uma população heterogênea de vesículas unilamelares e MVLs na faixa nanométrica (LAPINSKI et al., 2007).

Após o processo de rotaevaporação (15 minutos a 35°C), o filme lipídico foi liofilizado por 2 horas para a remoção completa do solvente e, em seguida, foi hidratado com PBS (pH 7,4) contendo 200 µM de BTCI. A suspensão foi agitada em vórtex até a completa dispersão do filme lipídico e submetida ao processo de sonicação em gelo (4 ciclos de 2 minutos com repouso de 1 minuto a cada ciclo) ou de extrusão (11 passagens por membrana de policarbonato com poros de 200 nm).

#### **4.5.5.2 Método de remoção de detergente**

Esse método consiste na mistura de detergentes e lipídios em solução aquosa, contendo proteína a ser encapsulada, seguida da remoção gradual dos detergentes favorecendo a formação de lipossomos unilamelares (SZOKA et al., 1980; GREGORIADIS, 2006).

Após processo de rotaevaporação (15 minutos a 35°C), o filme lipídico foi liofilizado por 2 horas para a remoção completa do solvente. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com PBS (pH 7,4) contendo 200 µM de BTCI e diferentes proporções do detergente *n-Octylglucoside*. A suspensão foi agitada em vórtex até a completa dispersão do filme lipídico e submetida ao processo de extrusão (11 passagens por membrana de policarbonato com poros de 200 nm).

#### **4.5.5.3 Método de evaporação de fase reversa (REV)**

O método REV consiste na formação de uma emulsão entre solução aquosa contendo proteínas e excesso de solventes orgânicos (éter isopropílico e clorofórmio, por exemplo). Em seguida, os solventes orgânicos são gradualmente removidos por evaporação e favorecem a formação de lipossomos unilamelares com compartimento aquoso maior, comparado aos outros métodos (SZOKA et al., 1980; GREGORIADIS, 2006).

O protocolo de evaporação de fase reversa foi elaborado com base em metodologia previamente descrita (ZHU et al., 2009 a). Uma solução de BTCl (200 µM) em PBS diluído 10 vezes foi adicionada a uma mistura de solventes orgânicos na proporção de 1:3, v/v. A composição da mistura de solventes orgânicos consistiu em lipídios dissolvidos em clorofórmio / éter isopropílico (4:3, v/v). A mistura foi submetida à sonicação constante em gelo por 4 minutos até a formação de uma emulsão homogênea. Uma dispersão aquosa de lipossomos foi formada após a remoção dos solventes orgânicos por rotaevaporação a 38°C por 1 hora.

#### **4.5.5.4 Método de congelamento e descongelamento (F / T)**

O método F/T consiste em diversos ciclos rápidos de congelamento e descongelamento, onde partículas de gelo formadas a cada ciclo, rompem as VMLs resultando em lipossomos unilamelares (SZOKA et al., 1980; GREGORIADIS, 2006). Após o processo de rotaevaporação (15 minutos a 35 °C), o filme lipídico foi liofilizado por 2 horas para a remoção completa do solvente e, em seguida, foi hidratado com PBS (pH 7,4) contendo 200 µM de BTCl. A suspensão foi agitada em

vórtex até a completa dispersão do filme lipídico. Em seguida, 10 ciclos entre banho-maria a 40°C (3 minutos) e nitrogênio líquido (1 minuto) foram realizados.

#### **4.5.5.5 Método de desidratação e reidratação (DRV)**

Esse método consiste na ruptura de lipossomos unilamelares vazios, durante o processo de congelamento e liofilização, na presença do composto a ser encapsulado. Em seguida, os lipossomos encapsulam o composto de interesse e recuperam sua integridade à medida que são reidratados gradativamente. A adição de açúcares nas amostras previne a fusão dos lipossomos e os mantém com tamanhos na ordem de nanômetros (KIRBY et al., 1984; GREGORIADIS et al., 1999).

O protocolo de DRV foi estabelecido baseado em metodologia previamente descrita (GREGORIADIS et al., 1999). Após processo de rotaevaporação (15 minutos a 35 °C), o filme lipídico foi liofilizado por 2 horas para a remoção completa do solvente. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com PBS diluído 10 vezes, agitado em vórtex até a completa dispersão do mesmo e submetido à extrusão (11 passagens por membrana de policarbonato com poros de 200 nm) para a obtenção de lipossomos unilamelares. Uma solução de maltose contendo 200 µM de BTCl foi adicionada à suspensão de lipossomos, na proporção de 3:1 de açúcar : lipídio (p/p). A mistura foi congelada e, finalmente liofilizada por 12 horas. Os lipossomos foram reidratados com água deionizada (correspondendo a um 1/10 do volume inicial da suspensão), agitados em vórtex e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, PBS foi acrescentado para restaurar o volume inicial da suspensão.

#### **4.5.6 Modificação da superfície de lipossomos**

Lipossomos catiônicos foram obtidos com a adição do fosfolípido 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), em diferentes proporções, na composição lipossomal. Lipossomos com transferrina conjugada em sua superfície foram obtidos como descritos a seguir. Primeiramente, transferrina liofilizada foi diluída (na proporção de 2:1 razão molar), em solução de copolímero pNP-PEG<sub>2000</sub>-PE preparada em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 100 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8 mM, pH 8,5) e incubada sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de transferrina não conjugada foi removida por diálise em membrana com limite de exclusão de 300 kDa por 3 horas a 4 °C. A quantidade de transferrina conjugada foi determinada por kit de Bradford segundo instruções do fabricante. A adição de transferrina conjugada à PEG<sub>2000</sub>-PE (Tf-PE) na superfície de lipossomos foi feita pelo método de pós-inserção com micelas (ALLEN et al., 2002), por meio da incubação de dispersão de micelas de Tf-PE (proporções de 0,25 a 2% razão molar) com lipossomos por 12 horas sob agitação a 4 °C.

#### **4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS**

Para a caracterização das micelas, o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta foram determinados (item 4.6.1). Para a caracterização dos lipossomos, além da avaliação do diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta, parâmetros referentes à concentração de lipídios, porcentagem de encapsulação, atividade inibitória e estabilidade também foram analisados.

#### **4.6.1 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta**

O diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das nanoestruturas contendo BTCl foram determinados. As amostras foram diluídas 10 vezes em água deionizada e lidas utilizando o equipamento Zeta Plus. Os dados de diâmetro hidrodinâmico obtidos foram calculados pelo software Zeta Plus a partir relação entre o sinal da intensidade da luz espalhada e a porcentagem de massa da amostra em solução.

#### **4.6.2 Dosagem de lipídios**

Para quantificar a concentração de lipídios, a metodologia de STEWART (1980) ou o kit *Phospholipid C* foram utilizados. Para a metodologia de STEWART, 200 µL da suspensão de nanoestruturas foram evaporados a 90°C para a remoção da água. Após a adição de 2 mL de clorofórmio aos lipídios secos, 2 mL da solução de tiocianato férrico (27,03 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; 30,4 g NH<sub>4</sub>SCN; água destilada em quantidade suficiente para 1 L) foram adicionados às amostras. As mesmas foram agitadas em vórtex por 2 minutos e a fase inferior foi analisada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm.

Para o kit *Phospholipid C*, as nanoestruturas foram diluídas 40 vezes em solução de detergente CHAPS 1% (v/v) e 20 µL foram transferidos para uma placa de 96 poços. Em seguida, 80 µL do reagente de revelação foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 15 minutos a 37°C. A absorbância das amostras foi determinada em comprimento de onda de 600 nm.

#### **4.6.3 Determinação da porcentagem de encapsulação**

Para a determinação da porcentagem de encapsulação do BTCl em lipossomos é importante separar proteínas encapsuladas de proteínas não-encapsuladas. Para isso, diferentes métodos de separação foram testados.

#### **4.6.3.1 Filtração / Centrifugação**

Os lipossomos foram aplicados na porção superior do filtro Microcon (limite de exclusão de 100 kDa), e a suspensão foi centrifugada a 10000 g por 3 ciclos de 15 minutos a 4 °C. A cada ciclo, 350 µL de PBS foi adicionado à porção superior do filtro para lavar os lipossomos e otimizar a remoção de BTCl não-encapsulado. Após a centrifugação, volumes da porção superior (lipossomos) e inferior do filtro foram armazenados separadamente a 4°C.

#### **4.6.3.2 Diálise**

Os lipossomos foram transferidos para membranas de diálise (com limite de exclusão de 300 kDa) e dialisados sob agitação em PBS por 12 horas a 4°C. Durante esse período, o PBS foi trocado a cada 6 horas. Para lipossomos preparados pelo método de "remoção de detergente" (item 4.5.5.2), as amostras foram dialisadas nas mesmas condições acima por 36 horas, com troca de PBS a cada 4 horas.

#### **4.6.3.3 Cromatografia de exclusão molecular**

Os lipossomos foram aplicados em uma coluna cilíndrica (2,7 X 40 cm) contendo a resina Sepharose CL-4B equilibrada com PBS (pH 7,4). Um fluxo de 0,5 mL/minuto foi aplicado e frações de 1 mL foram coletadas.

Após a separação de BTCl não-encapsulado, a concentração de BTCl encapsulado foi determinada pela metodologia de Lowry (WALKER, 1996). Quinhentos microlitros da solução A (20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 4 g NaOH; 1,6 g tartarato de



sódio e potássio; 10 g SDS; água destilada em quantidade suficiente para 1 L) : solução B (4 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; água destilada em quantidade suficiente para 100 mL), na proporção de 100 : 1 (v/v), foram incubados com 100 µL de solução contendo 40 µL de lipossomos, 20 µL água deionizada, 20 µL Triton X-100 5% e 20 µL CHAPS 5%. Em seguida, 100 µL de solução de Folin foram adicionados a cada amostra, agitados em vórtex e incubados por 2 horas a 37°C na ausência de luz. Posteriormente, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 730 nm e a porcentagem de encapsulação foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de encapsulação (\%)} = \frac{[\text{Proteínas encapsuladas (mg)} * 100]}{\text{Proteínas totais (mg)}}$$

#### 4.6.4 Atividade inibitória de BTCl após encapsulação em lipossomos

Para verificar se a atividade inibitória do BTCl foi mantida após os métodos de encapsulação e separação de BTCl não-encapsulado, a suspensão de lipossomos foi incubada com Triton X-100 0,25% por 30 minutos a 37°C, para romper as nanoestruturas e tornar a proteína encapsulada mais acessível. Triton X-100 não foi utilizado na determinação da presença de BTCl na superfície dos lipossomos. Em seguida, um ensaio de atividade inibitória específica para tripsina e quimotripsina foi realizado como descrito abaixo.

**Tripsina:** a tripsina foi dissolvida em solução HCl 1 mM para a concentração final de 64 µg/mL. Seu respectivo substrato sintético (*Na-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride* – BAPNA) foi dissolvido em 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 500 µL de tampão de ensaio para tripsina (Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM,

pH 8,2) para a concentração final de 430 µg/mL. Quarenta µL de lipossomos (com ou sem Triton X-100) foram dissolvidos em tampão de ensaio para tripsina, incubados com 40 µL de tripsina por 15 minutos à 37°C, em placas de 96 poços. Em seguida, 200 µL de substrato foram adicionados a solução anterior e a mistura foi incubada por 30 minutos à 37°C. Trinta µL de ácido acético 30% foram utilizados para parar a reação. A absorbância de cada amostra foi determinada em comprimento de onda de 405 nm.

**Quimotripsina:** a quimotripsina foi dissolvida em solução HCl 1 mM para a concentração final de 630 µg/mL. Seu respectivo substrato sintético (*N* - *glutaryl* - *L* - *phenylalanine* - *p* - *nitroanilide* - GPNA) foi dissolvido em 500 µL de DMSO e 500 µL de tampão de ensaio para quimotripsina (Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7,6) até a concentração final de 400 µg/mL. Quarenta µL de lipossomos (com ou sem Triton X-100) foram dissolvidos em tampão de ensaio para quimotripsina e incubados com 40 µL de quimotripsina por 15 minutos à 37°C em placa de 96 poços. Em seguida, 200 µL de substrato foram adicionados à solução anterior e a mistura foi incubada por 30 minutos à 37°C. Trinta µL de ácido acético 30% foram utilizados para interromper a reação. A absorbância de cada amostra foi determinada em comprimento de onda de 405 nm.

#### **4.6.5 Estabilidade**

Após a produção dos lipossomos, alíquotas de cada amostra foram estocadas a 4 °C e analisadas a cada 15 dias (por um período total de 30 dias) quanto a formação de cremagem ou precipitados; e quanto ao diâmetro hidrodinâmico e ao potencial zeta.

## **4.7 EFEITOS DO BTCI NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA, *IN VITRO*.**

### **4.7.1 Linhagens Celulares**

As linhagens celulares de câncer de mama utilizadas nesse estudo foram as MCF-7 (humano) e 4T1 (murino). A linhagem de câncer de colo do útero Hela (humano) também foi utilizada em alguns ensaios. As células MCF-7 e Hela foram obtidas do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC). A linhagem 4T1 foi cedida pela Dr<sup>a</sup> Suzanne Ostrand-Rosenberg da Universidade de *Maryland*, EUA.

### **4.7.2 Manutenção da cultura de células**

Todos os procedimentos foram realizados com materiais esterelizados e em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 30 a 40 minutos antes do uso. Alíquotas de células de câncer foram removidas do estoque, em nitrogênio líquido, e descongeladas rapidamente a 37°C. Quinhentos µL das alíquotas foram lentamente adicionados em 3 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico). Esse meio de cultura foi utilizado em todos os outros procedimentos experimentais. Em seguida, as células foram centrifugadas a 750 g por 5 minutos, ressuspensas em 5 mL de meio de cultura DMEM, transferidas para um frasco de cultura de células e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para assegurar a qualidade das células a serem utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas o meio de cultura foi substituído por um meio de cultura novo. A cultura de células foi observada em microscópio de luz invertido e monitorada quanto ao

crescimento celular, características morfológicas e presença de contaminantes. Ao atingir o estágio de confluência (elevada densidade de células em uma determinada área) as células foram removidas do frasco de cultura e recultivadas em uma densidade menor seguindo o procedimento descrito a seguir.

O meio de cultura foi descartado e 2 mL de solução de tripsina-EDTA foram adicionados ao frasco de cultura para a remoção da monocamada de células. Após 2 minutos de incubação em estufa a 37°C, a remoção das células foi observada em microscópio de luz invertido. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada a 750 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente, 10% das células foram recultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O restante foi utilizado em experimentos ou recebeu a adição de hipoclorito de sódio e detergente e, após 24 horas foram descartados.

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

### 4.7.3 Tratamento das células de câncer com BTCI livre ou encapsulado em nanoestruturas

Ao atingir o estágio de confluência, as células de câncer foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas, como descrito no item 4.7.2. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura completo. Para a determinação do número de células, 10 µL da suspensão de células foi adicionado a 40 µL de solução de azul tripan (0,4%, p/v, diluídos em PBS). Oito µL dessa mistura foram depositados gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

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

As células contadas foram transferidas para placas de cultura e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 12 a 16 horas para a completa adesão das células no fundo da placa. O tipo de placa de cultura e o número de células/poço variaram de acordo com o experimento realizado. Em seguida, as células foram incubadas com BTCI livre, encapsulado em micelas ou em lipossomos, como descrito nos itens a seguir.

### 4.7.4 Interação de nanoestruturas com células de câncer

A interação (adesão / internalização) de nanoestruturas com células tumorais foi avaliada por citometria de fluxo e por microscopia confocal. Para a detecção das nanoestruturas por essas técnicas, 1% (razão molar) do marcador fluorescente Rodamina-PE foi adicionado à composição das micelas ou dos lipossomos. O BTCI foi marcado com a sonda fluorescente *NHS-Rodamine* (Fisher, EUA) segundo

instruções do fabricante. Resumidamente, amostras de BTC1 foram diluídas em PBS para a concentração final de 2 mg/mL. Um excesso de 5M de *NHS-Rodamine* foi adicionado à solução de BTC1 e a mistura foi incubada por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, rodamina não-conjugada foi removida por diálise (limite de exclusão de 2000 Da) em PBS, por 48 horas sob agitação a 4°C, com trocas sucessivas a cada 6 horas.

#### **4.7.4.1 Citometria de Fluxo**

Células tumorais foram transferidas para placa de 12 poços na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço e incubadas a 37°C como descrito no item 4.7.3. As células foram tratadas com 0,1 mM micelas de PEG-PE ou 0,4 mg/mL de lipossomos em meio de cultura DMEM, com ou sem 10% soro fetal bovino, por 6 horas 37°C. O meio de cultura foi então descartado e as células lavadas duas vezes com meio de cultura sem soro. As células foram removidas dos poços com a adição de 500 µL de solução de tripsina-EDTA e incubação a 37°C por 2 minutos. A tripsina foi bloqueada com a adição do mesmo volume de meio de cultura DMEM com 10% soro fetal bovino. A suspensão (meio de cultura, tripsina e células) foi centrifugada a 750 g por 5 minutos, e as células ressuspensas em 100 µL de PBS gelado. As células foram avaliadas em citômetro de fluxo no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 a 580 nm). Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa *CellQuest 3.0.1* (Becton & Dickinson, EUA). O número de eventos lidos pelo equipamento foi de 10000 por amostra.

O papel da transferrina (conjugada à superfície de lipossomos) na interação com as células tumorais, foi avaliado por ensaio de competição com receptores de transferrina. As células foram pré-tratadas com 1 mg/mL de transferrina livre em

meio de cultura sem soro por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as nanoestruturas foram adicionadas e incubadas por mais 6 horas à 37°C. As células foram removidas da placa de cultura e processadas como descrito no parágrafo acima. Para avaliar a proporção de nanoestruturas internalizadas, as células já tratadas e removidas da placa de cultura foram incubadas com solução de azul tripan na proporção de 1:4 (v/v) por 5 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo.

#### **4.7.4.2 Microscopia Confocal**

A microscopia confocal foi utilizada para visualizar a internalização e a localização dos lipossomos / BTCl na célula tumoral. Dentro de capela de fluxo laminar, lamínulas de vidro (30 x 30 mm) foram mergulhadas em álcool 90% por 15 minutos e esterilizadas em bico de Bunsen até a completa evaporação do álcool. Após serem resfriadas, as lamínulas foram depositadas em placas de 6 poços. Duzentos e cinquenta microlitros de células tumorais ( $10^4$  células) foram depositadas cuidadosamente sobre as lamínulas e incubadas por 20 minutos a 37°C. Em seguida, 1 mL de meio de cultura foi adicionado em cada poço e as células foram incubadas por mais 12 horas a 37°C. As células foram tratadas com 0,4 mg/mL de lipossomos em meio de cultura sem soro, por 9 horas a 37°C, lavadas duas vezes com meio de cultura sem soro e fixadas em 4% paraformaldeído, preparado em PBS, por 15 minutos.

A co-localização dos lipossomos / BTCl com lisossomos, foi observada em células imunomarcadas contra o antígeno LAMP-2 (específico para lisossomos). As células foram lavadas duas vezes com PBS-BSA 1% (v/v) e permeabilizadas por 10 minutos com saponina 0,2% (v/v), preparada em PBS-BSA 1% (v/v). Para o bloqueio de sítios inespecíficos, as células foram lavadas duas vezes com PBS-BSA 1% e

incubadas por 30 minutos com PBS-BSA 1%. O anticorpo primário anti-LAMP2 foi diluído em PBS-BSA 1% na proporção de 1:50 (v/v) e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS-BSA 1% e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado ao fluoróforo AlexaFluor 488 (proporção de 1:1000 v/v), por 1 hora à temperatura ambiente e protegido da luz. Após duas lavagens em PBS-BSA 1%, as lamínulas foram removidas da placa e montadas em lâminas de vidro com meio de montagem Fluoromount-G. Uma fina camada de esmalte transparente foi depositada nas bordas das lamínulas para melhorar a fixação das mesmas à lâmina e evitar a evaporação do meio de montagem. As lâminas foram então examinadas em microscópio Confocal Zeiss LSM Meta 510. Cerca de 10 imagens, de diferentes regiões da lamínula, foram digitalizadas para cada grupo. As imagens foram processadas e analisadas utilizando o software gratuito *Image J* (NIH, EUA). Os coeficientes de co-localização de Pearson e de Manson (ZHU et al., 2009 b) foram calculados pelo software e utilizados para determinar a co-localização dos lipossomos / BTCI com lisossomos.

#### **4.7.5 Viabilidade Celular**

A citotoxicidade em células tumorais do BTCI livre, encapsulado em micelas ou em lipossomos, foi avaliada pelo ensaio do MTT (MOSMANN, 1983). Em células viáveis, enzimas mitocôndriais, como a succinildesidrogenase, reduzem o substrato MTT (*3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) formando formazan, um produto de cor azulada. Dessa forma, a quantificação da produção de formazan por células submetidas a determinado tratamento está correlacionada com sua viabilidade.



As células foram cultivadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^3$  células/poço) na presença ou ausência de diferentes concentrações de BTCI, micelas ou lipossomos por 6 a 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Para esse ensaio, as amostras foram esterilizadas por filtração em membrana com poros de  $0,45 \mu\text{m}$ . Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e  $15 \mu\text{L}$  de solução de MTT (5 mg/mL em PBS) foram acrescentados a  $135 \mu\text{L}$  de um novo meio de cultura e incubados com as células por três a quatro horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, a solução de MTT foi removida,  $100 \mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados em cada poço e a absorbância da solução resultante foi analisada em 595 nm.

#### **4.8 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM AMOSTRAS DE BTCI**

Diferentes amostras de BTCI foram incubadas, na forma livre, com células tumorais e seus efeitos na viabilidade celular das mesmas foram determinados, como descrito no item 4.7.5. As amostras foram então caracterizadas por cromatografia de exclusão molecular e HPLC de fase reversa; eletroforese em gel de poliacrilamida; atividade inibitória; e presença de ácidos graxos como descrito abaixo. As características das amostras foram comparadas entre si no intuito de se tentar estabelecer uma correlação com o perfil de citotoxicidade.

##### **4.8.1 Cromatografia de exclusão molecular e HPLC em fase reversa**

As amostras de BTCI foram aplicadas em coluna de exclusão molecular Shodex KW804 (300 x 8 mm). A fase móvel utilizada foi PBS (pH 7,4) com fluxo de  $0,25 \text{ mL/minuto}$ . A eluição das amostras foi monitorada à temperatura ambiente, por leituras de absorbância no comprimento de onda de 280 nm. Para estimar a massa

molecular das amostras, um marcador com proteínas de massas moleculares conhecidas foi aplicado na coluna sob as mesmas condições acima.

Amostras de BTCI foram diluídas em água deionizada e aplicadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa utilizando uma coluna C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm). As amostras foram eluídas por meio da aplicação de gradiente de acetonitrila na proporção de 0 - 32%, por 5 minutos, e 32 - 37%, por 20 minutos, com fluxo de 1 mL/min. A eluição das amostras foi monitorada à temperatura ambiente, por leituras de absorbância no comprimento de onda de 216 nm.

#### **4.8.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Amostras de BTCI (60 µg) foram diluídas em água deionizada e misturadas em tampão de amostra para eletroforese contendo 100 mM do agente redutor DTT (condições redutoras). Para analisar as amostras em condições não-redutoras, o reagente DTT não foi incluído no tampão. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 16% e a corrida eletroforética foi realizada com voltagem constante de 130 V. O marcador de amostra utilizado continha amostras de massas moleculares conhecidas variando de 10 a 200 kDa. Após a corrida, os géis foram fixados e corados pelo método de precipitação com prata com o kit *Silver Stain Plus* (Bio-Rad, EUA), segundo instruções do fabricante.

#### **4.8.3 Atividade inibitória e detecção de ácidos graxos**

As amostras de BTCI foram comparadas quanto a atividade inibitória de tripsina e quimotripsina, com o método descrito no item 4.6.4, sem a adição de Triton X-100.

A presença de ácidos graxos nas amostras de BTCI foi detectada por método enzimático com kit *Free Fatty Acid Quantification* (BioVision, EUA), segundo instruções do fabricante.

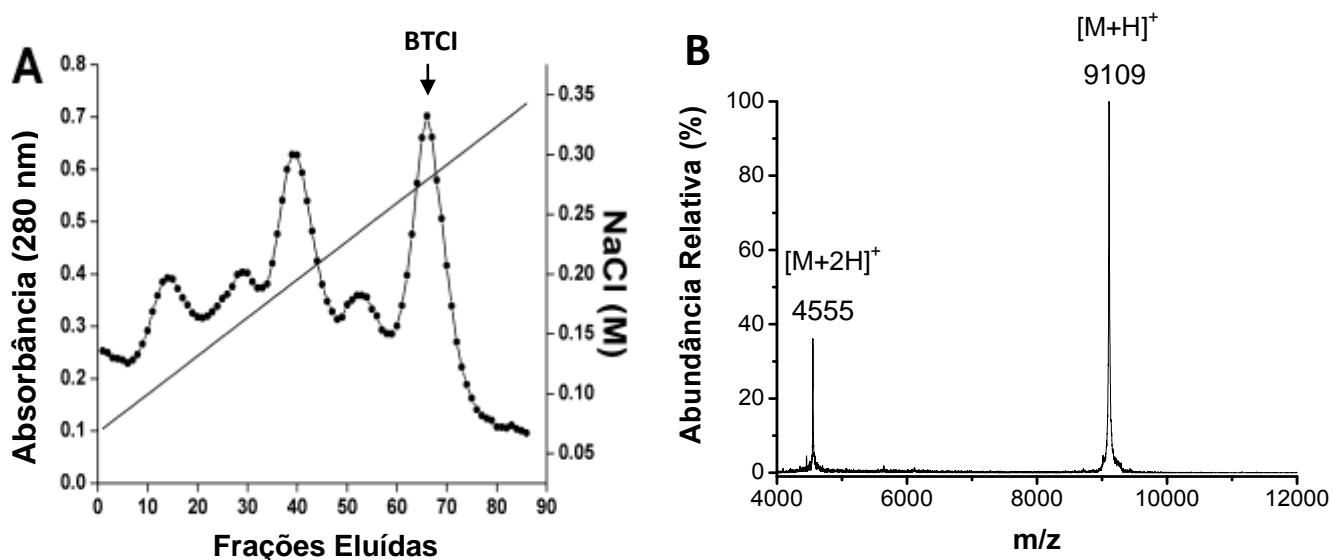
#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados referentes aos experimentos realizados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de experimentos independentes realizados em triplicata. A determinação das diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos testes avaliados foi feita por análise de variância (ANOVA) com teste estatístico de *Sheffé*, utilizando-se o software *StatView* versão 5.0 (EUA).

## 5. RESULTADOS

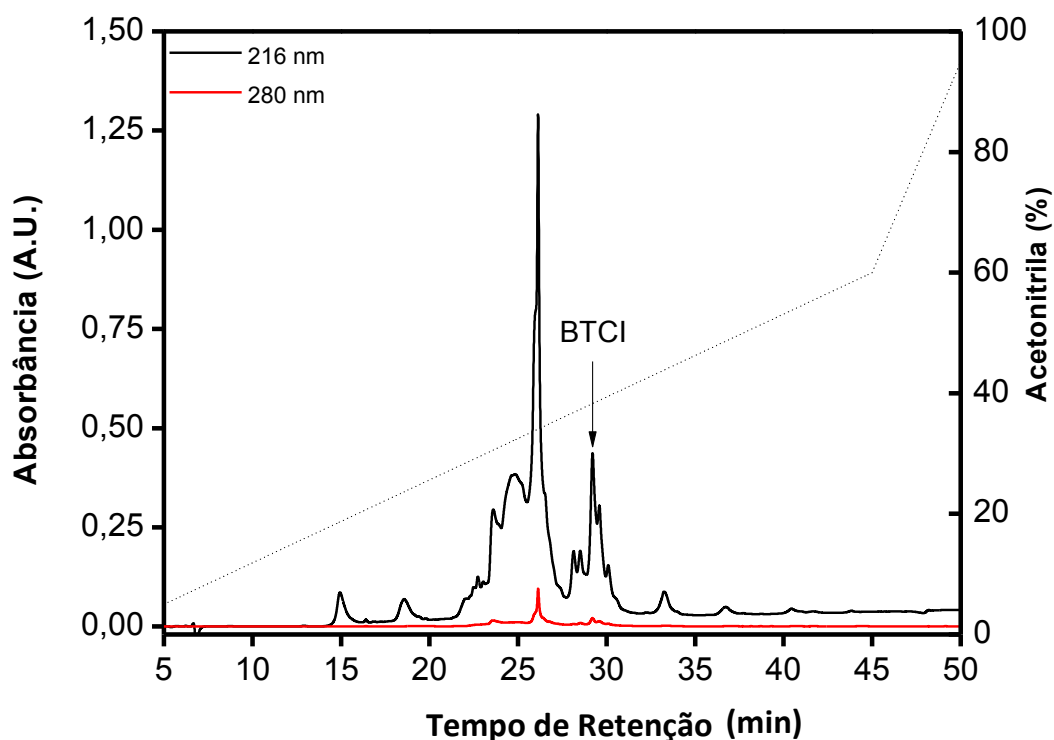
### 5.1 Obtenção de extrato de sementes e de BTCl

A figura 15A mostra o cromatograma obtido no processo de purificação do inibidor de protease BTCl a partir de extrato de sementes de *V. unguiculata* (EB). O cromatograma apresenta picos bem delimitados e pontos não dispersos. As frações de interesse do EB foram eluídas entre as frações 10 a 80, e o BTCl entre as frações 65 e 80. O rendimento da purificação de BTCl foi variável. A partir de 500 g de sementes de *V. unguiculata*, foi possível obter cerca de 40 a 85 mg de BTCl puro, o que corresponde cerca de 8,5% do total de proteínas de cerca de 1 g de extrato. Após a diálise e liofilização, as frações cromatográficas foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS). A figura 15B mostra que o BTCl está puro e apresenta  $[M+H]^+$  de 9109 Da.

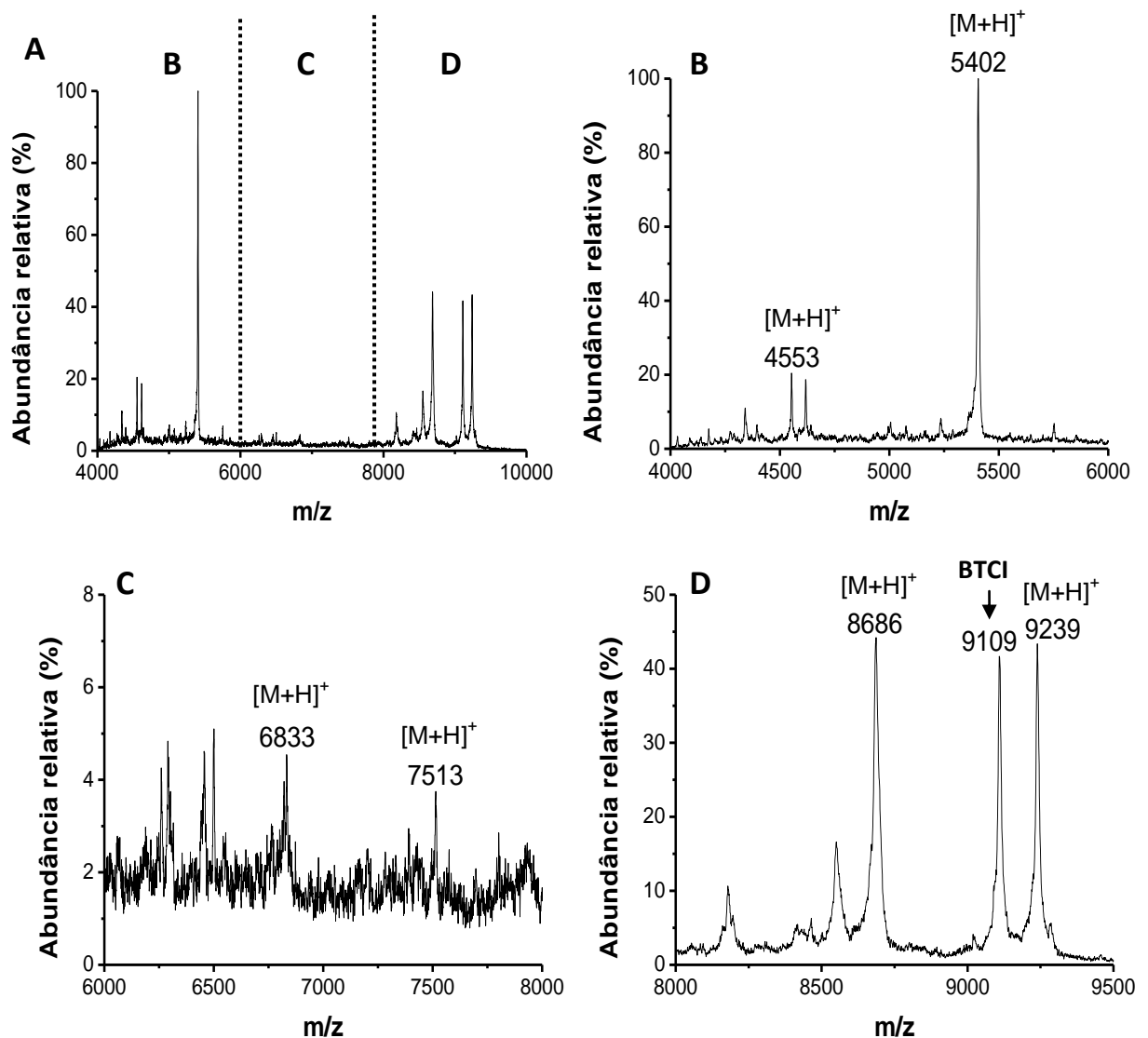


**Figura 15.** A) Purificação do inibidor de proteases BTCl por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) a partir do extrato obtido de sementes de *Vigna unguiculata*. Frações de 10 a 80: extrato. Frações de 65 a 80: BTCl puro. B) Espectro de MALDI-TOF/MS mostra picos de 9109 e 4555 Da correspondentes às massas do BTCl monocarregado e do BTCl duplamente carregado, respectivamente, e indica que a fração cromatográfica de BTCl está pura nessa faixa de massa.

O EB também foi submetido à HPLC em fase reversa para otimizar o fracionamento e facilitar o processo de separação / caracterização dos componentes protéicos da amostra (Figura 16). Uma análise preliminar mostrou que o extrato é composto por um conjunto de cerca de 10 peptídeos / proteínas com massas moleculares variando entre 4000 a 10000 Da (Figura 17). A identificação das moléculas presentes no extrato está em andamento e não foi o propósito do presente estudo.



**Figura 16.** Cromatograma do extrato de sementes *Vigna unguiculata* fracionado por HPLC em fase reversa em coluna C<sub>18</sub> (250 x 10 mm). O gradiente utilizado foi linear: acetonitrila (5 a 60% em 45 min) e fluxo de 3 mL/min. O monitoramento foi realizado nos comprimentos de onda de 216 nm (preto) e 280 nm (vermelho).

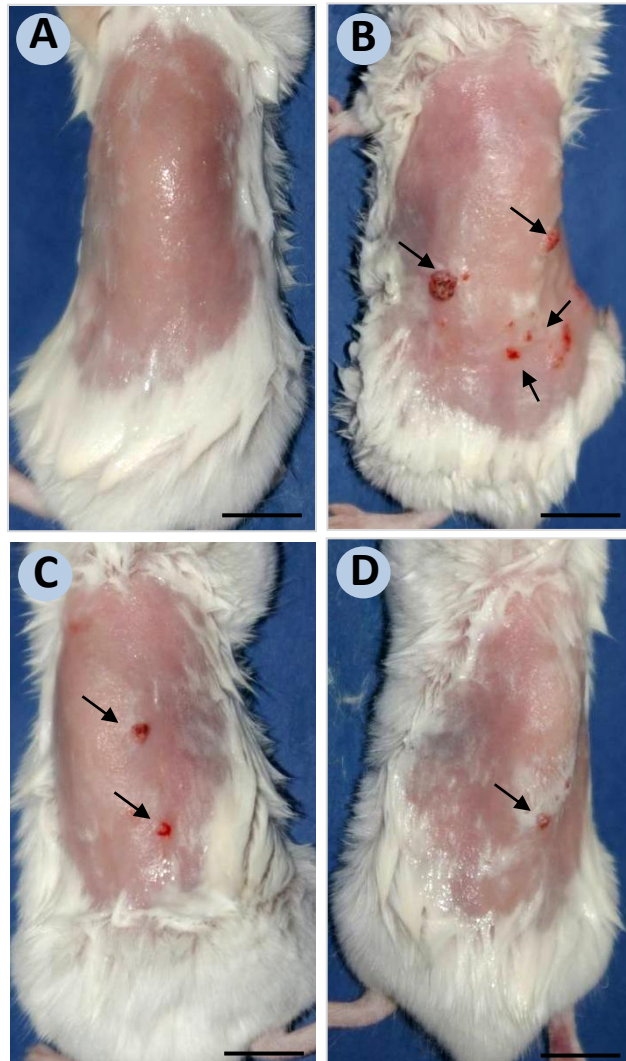


**Figura 17.** Espectros de MALDI-TOF/MS de extrato de sementes de *Vigna unguiculata*. A) Picos correspondentes ao conjunto de proteínas com diferentes massas moleculares encontradas no extrato. As figuras de B a D representam ampliações de regiões da figura A.

## 5.2 Tratamento preventivo com BTCI e extrato de sementes contra câncer de pele não-melanoma, *in vivo*.

Os efeitos preventivos da aplicação tópica de BTCI ou extrato em camundongos que receberam a indução química de câncer de pele não-melanoma foram avaliados após 15 semanas. Os aspectos macroscópicos da pele do dorso dos camundongos após o período de tratamento podem ser observados na Figura

18. Lesões pré-malignas, caracterizadas por projeções da pele (papilomas), com dimensões maiores e mostrando aspecto ulcerado, encontram-se em maior número no grupo controle. De uma forma geral, os grupos tratados com BTCI ou EB apresentaram o dorso com aspecto mais semelhante à da pele normal, com a presença de apenas algumas lesões pré-malignas menores (Figura 18).



**Figura 18.** Aspectos macroscópicos da pele do dorso de camundongos submetidos à indução química de câncer de pele não-melanoma. A) Camundongos (n=6) não receberam indução química ou tratamento na pele. B a D) Os camundongos (n=6) receberam indução química de câncer de pele não-melanoma no dorso e aplicação tópica por 15 semanas com solução aquosa de água destilada (B); solução aquosa de BTCl (C); ou extrato (D). →: lesões pré-malignas. Barra = 1 cm.

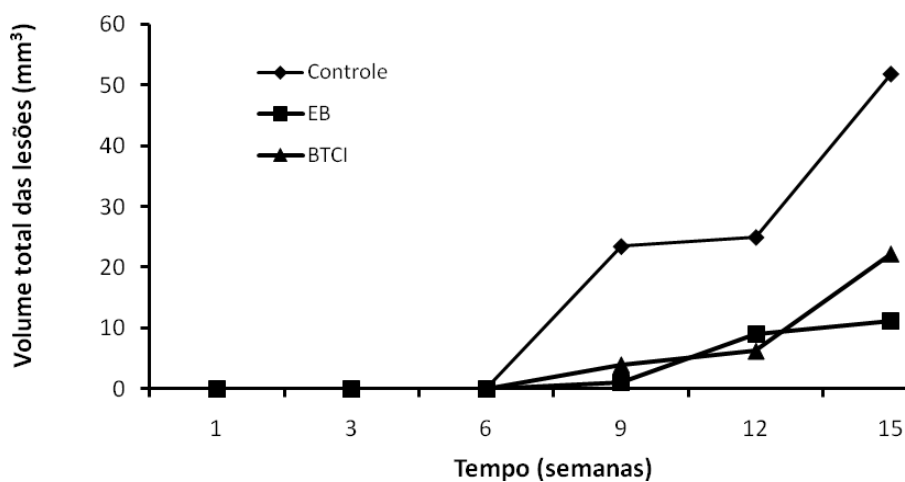


Apesar de não haver diferença no período de latência (aparecimento das primeiras lesões), as taxas de incidência de lesões pré-malígnas foram aproximadamente 50% menores nos grupos BTCl e EB quando comparadas com o grupo controle. Não houve mortalidade em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 3).

**Tabela 3.** Mortalidade, incidência, tempo de latência e número de lesões pré-malígnas de câncer de pele não-melanoma no dorso de camundongos (n=6) após 12 semanas de tratamento com água destilada (Controle), BTCl ou extrato de sementes de *Vigna unguiculata* (EB).

	Controle	BTCl	EB
Número de lesões / grupo	12	7	6
Animais com incidência de lesões	5/6	3/6	3/6
Tempo de latência (semanas)	4	4	4
Mortalidade	-	-	-

O volume das lesões pré-malígnas foi reduzido em animais tratados com BTCl. O grupo tratado com EB também apresentou redução no volume das lesões comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com o BTCl (Figura 19).



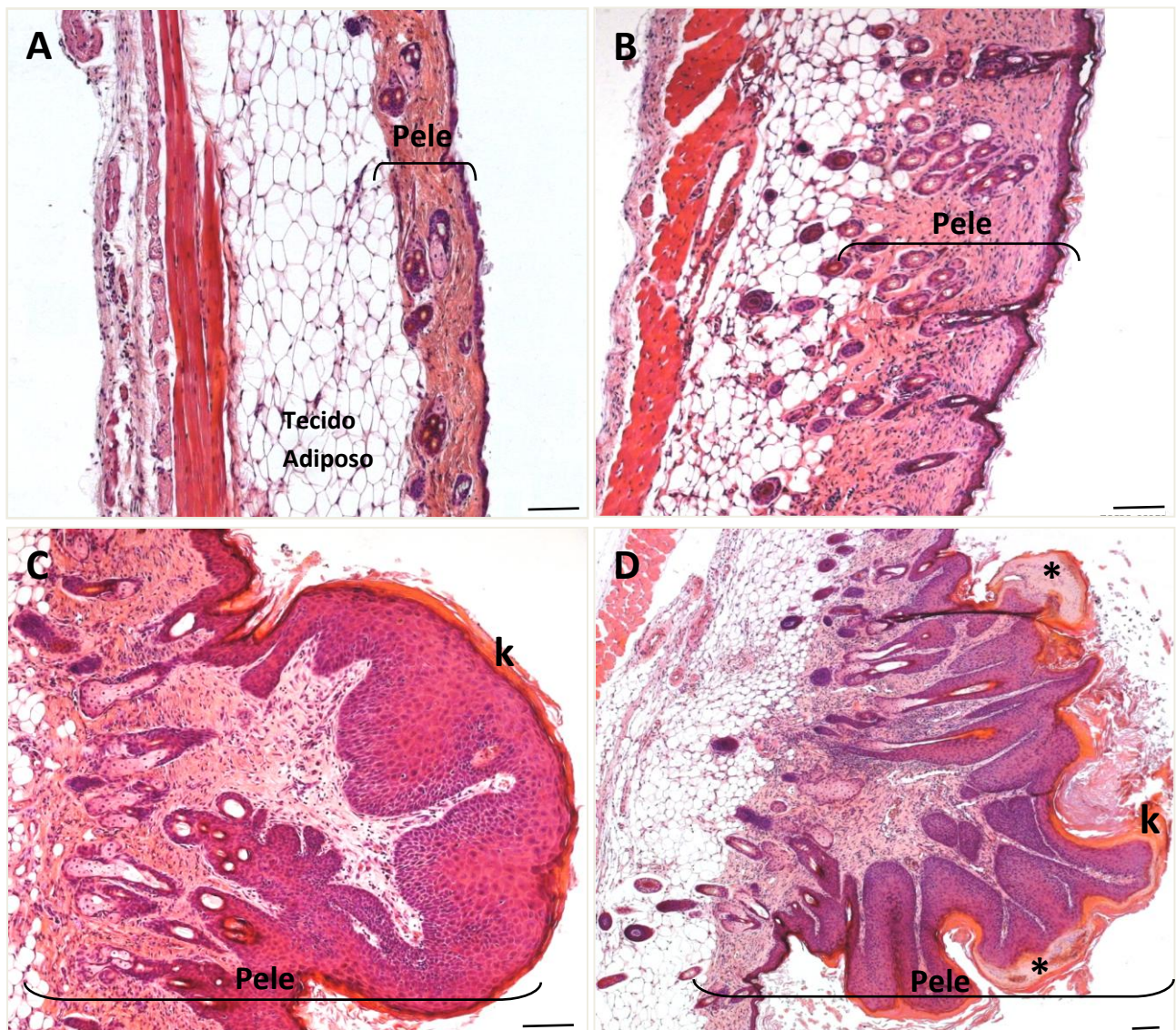
**Figura 19.** Volume total de lesões pré-malígnas de câncer de pele não-melanoma. Os camundongos (n=6) receberam indução química de câncer de pele não-melanoma no dorso e aplicação tópica com: água destilada (Controle), solução aquosa de BTCl ou extrato (EB) por 15 semanas.

### 5.2.1 Alterações Histopatológicas

A análise histológica ressaltou diferenças na morfologia e nas características histopatológicas da pele entre os grupos (Figura 20 e Tabela 4). A figura 20A mostra uma camada de pele delgada (mais externa) depositada sobre uma camada de tecido adiposo, que, por sua vez, localiza-se sobre uma camada de tecido muscular esquelético. Essa imagem representa a histologia de um camundongo normal, ou seja, que não foi submetido à indução química de câncer ou à tratamentos com proteínas. Nesse aumento, a organização histológica de animais tratados com EB assemelha-se ao grupo normal, apresentando apenas um aumento na espessura da pele. O aumento na espessura e a formação de uma pequena projeção da pele (lesão pré-maligna conhecida como papiloma) recoberta por uma fina camada de queratina é observada no grupo tratado com BTCI. Já no grupo controle, o qual após a indução química recebeu apenas tratamento com água destilada, observa-se a formação de um papiloma com alguns pontos de necrose (mais externo), numerosas reentrâncias, dimensões maiores e camada de queratina mais espessa que as observadas nos outros grupos (Figura 20D).

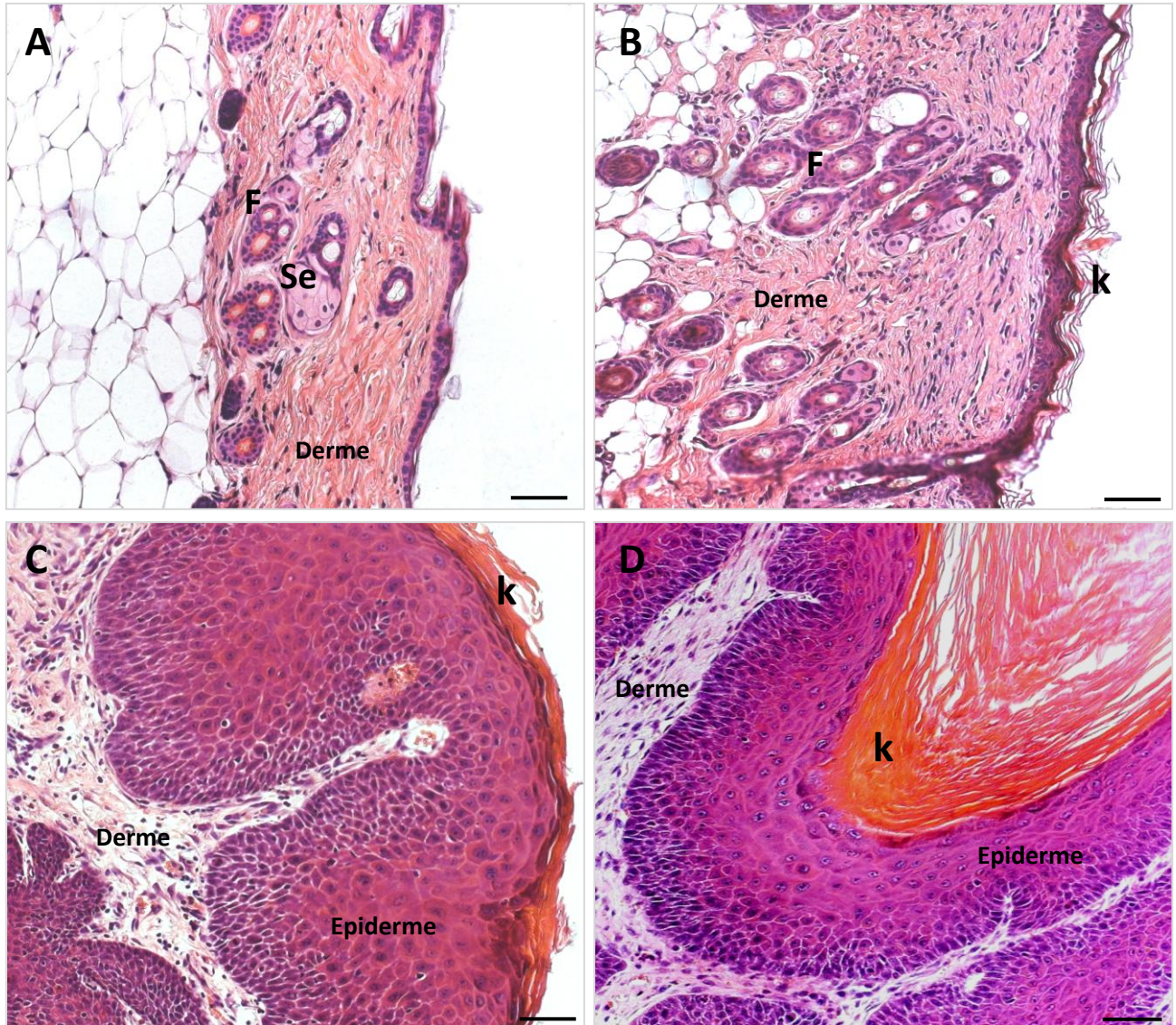
Analisando as imagens em um maior aumento (Figuras 21 e 22) foi possível observar com mais detalhes as camadas da pele e suas estruturas. De forma geral, a epiderme normal (camada mais externa da pele) de um camundongo é constituída por um epitélio simples, com apenas uma, ou pontualmente duas, camadas de células que estão apoiadas sobre um tecido conjuntivo (derme) contendo folículos pilosos e glândulas sebáceas (Figura 21A). A pele do grupo tratado com EB difere-se da pele normal por apresentar uma derme mais espessa, epiderme organizada em 4 a 6 camadas e recoberta com uma fina camada de queratina (Figura 21B). O

grupo tratado com BTCI apresenta uma camada espessa de queratina (hiperqueratose) recobrimdo a epiderme que sofreu um processo de estratificação. Nesse caso, as células se diferenciaram quanto à morfologia e se organizaram em camadas: células menores (região basal próxima á derme); células hipertróficas (núcleo e citoplasma maiores) na região central; e células de coloração mais escura com numerosos grânulos de queratina (região mais externa) (Figura 22C). Além da estratificação da epiderme e de hiperqueratose, o grupo que não recebeu tratamento apresentou mais alterações como: redução da coesão intercelular; figuras mitóticas e pontos de necrose (Figura 22D).



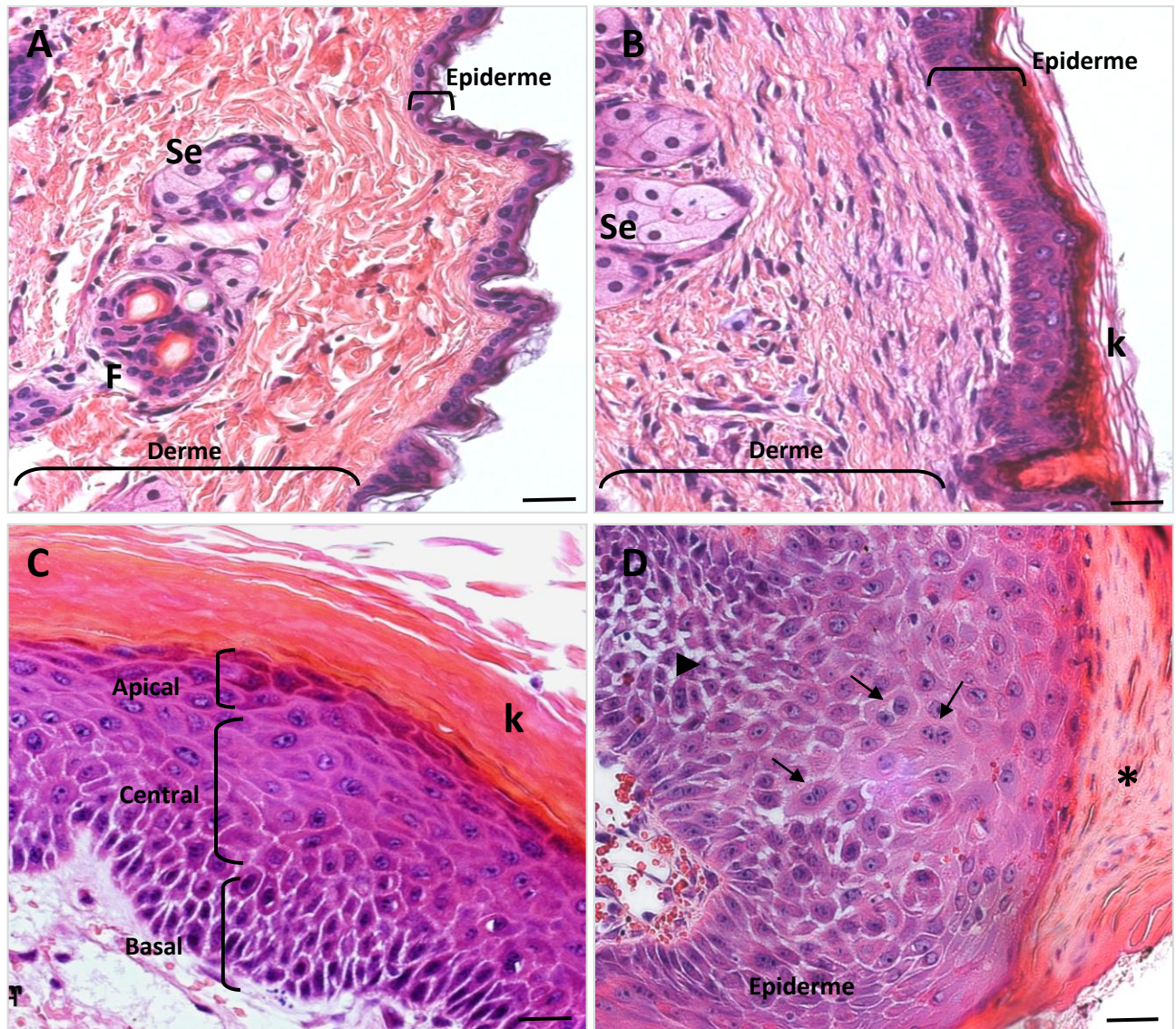
**Figura 20.** Histologia da pele do dorso de camundongos (Prancha 1). A) Camundongos (n=6) não receberam indução química ou tratamento na pele. B a D) Os camundongos (n=6) receberam indução química de câncer de pele não-melanoma no dorso e aplicação tópica por 15 semanas com solução aquosa de Extrato bruto (B); solução aquosa de BTCl (C) ou água destilada (D). Observar projeções da pele conhecidas com papilomas nas figuras C e D. \* representa pontos de necrose; k: camada de queratina. Barra = 100  $\mu$ m.





**Figura 21.** Histologia da pele do dorso de camundongos (Prancha 2). A) Camundongos (n=6) não receberam indução química ou tratamento na pele. B a D) Os camundongos (n=6) receberam indução química de câncer de pele não-melanoma no dorso e aplicação tópica por 15 semanas com solução aquosa de Extrato bruto (B); solução aquosa de BTCl (C) ou água destilada (D). k: camada de queratina; Se: glândulas sebáceas; F: folículos pilosos. Barra = 50 µm.





**Figura 22.** Histologia da pele do dorso de camundongos (Prancha 3). A) Camundongos (n=6) não receberam indução química ou tratamento na pele. B a D) Os camundongos (n=6) receberam indução química de câncer de pele não-melanoma no dorso e aplicação tópica por 15 semanas com solução aquosa de Extrato bruto (B); solução aquosa de BTCl (C) ou água destilada (D). Observar na figura C a estratificação da epiderme com células de morfologia alterada organizadas em 3 camadas (basal, média e apical). \* representa pontos de necrose; k: camada de queratina; Se: glândulas sebáceas; F: folículos pilosos;  $\rightarrow$ : figuras mitóticas;  $\blacktriangleright$ : baixa coesão intercelular. Barra = 20  $\mu$ m.

As características histopatológicas dos grupos investigados foram organizadas na Tabela 4. A frequência de alterações observadas no grupo tratado com BTCI e, principalmente no grupo tratado com EB, foi reduzida quando comparadas com o grupo controle.

**Tabela 4.** Alterações histopatológicas de lesões pré-malignas de câncer de pele não- melanoma. Após o início da indução química de câncer, os camundongos (n=6/grupo) receberam tratamento por 15 semanas com água destilada (Controle), BTCI ou extrato de sementes de *Vigna unguiculata* (EB).

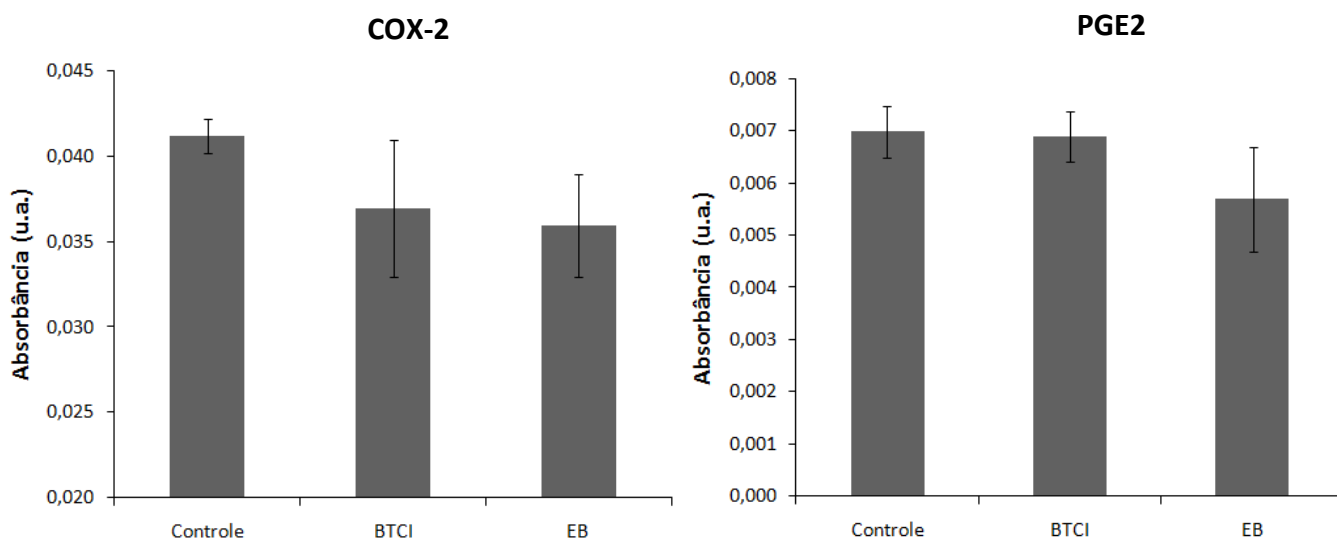
	<b>Controle</b>	<b>BTCI</b>	<b>EB</b>
Número de camadas da epiderme	5 a 12	3 a 9	3 a 5
Diferenciação das camadas da epiderme	+++++	+++++	+++
Necrose	+++	++	+
Figuras mitóticas	+++	++	+
Hiperqueratose (espessamento da camada de queratina)	++++	+++	+++
Vasos sanguíneos	+++++	++	++
Desmoplasia (aumento na quantidade de tecido conjuntivo)	+++++	+++	+++
Hiperplasia (número de células)	+++++	+++	++
Perda de polaridade (arranjo desordenado)	+++	++	+
Células multinucleadas	++++	++	+
Eosinofilia	+++	++	++
Acantólise (diminuição da coesão intercelular)	++++	+++	++
Infiltrado inflamatório	++	++	+

Frequência de características: + (rara); ++ (pouca); +++ (média); ++++ (alta); +++++ (abundante)

### 5.2.2 ELISA e Imunohistoquímica

O modelo de indução química de câncer de pele não-melanoma, utilizando-se as substâncias DMBA/TPA, é caracterizado pelo aumento na proliferação das células da epiderme e o aumento na concentração de cicloxigenase-2 (COX-2) e, como consequência, de um dos metabólitos do ácido araquidônico, como a prostaglandina E2 (PGE2) (DLUGOSZ et al., 2002). Inicialmente, as concentrações de COX-2 e PGE2 nos grupos experimentais foram comparadas por meio da técnica de ELISA (Figura 23). Observou-se uma tendência de aumento da COX-2 no grupo

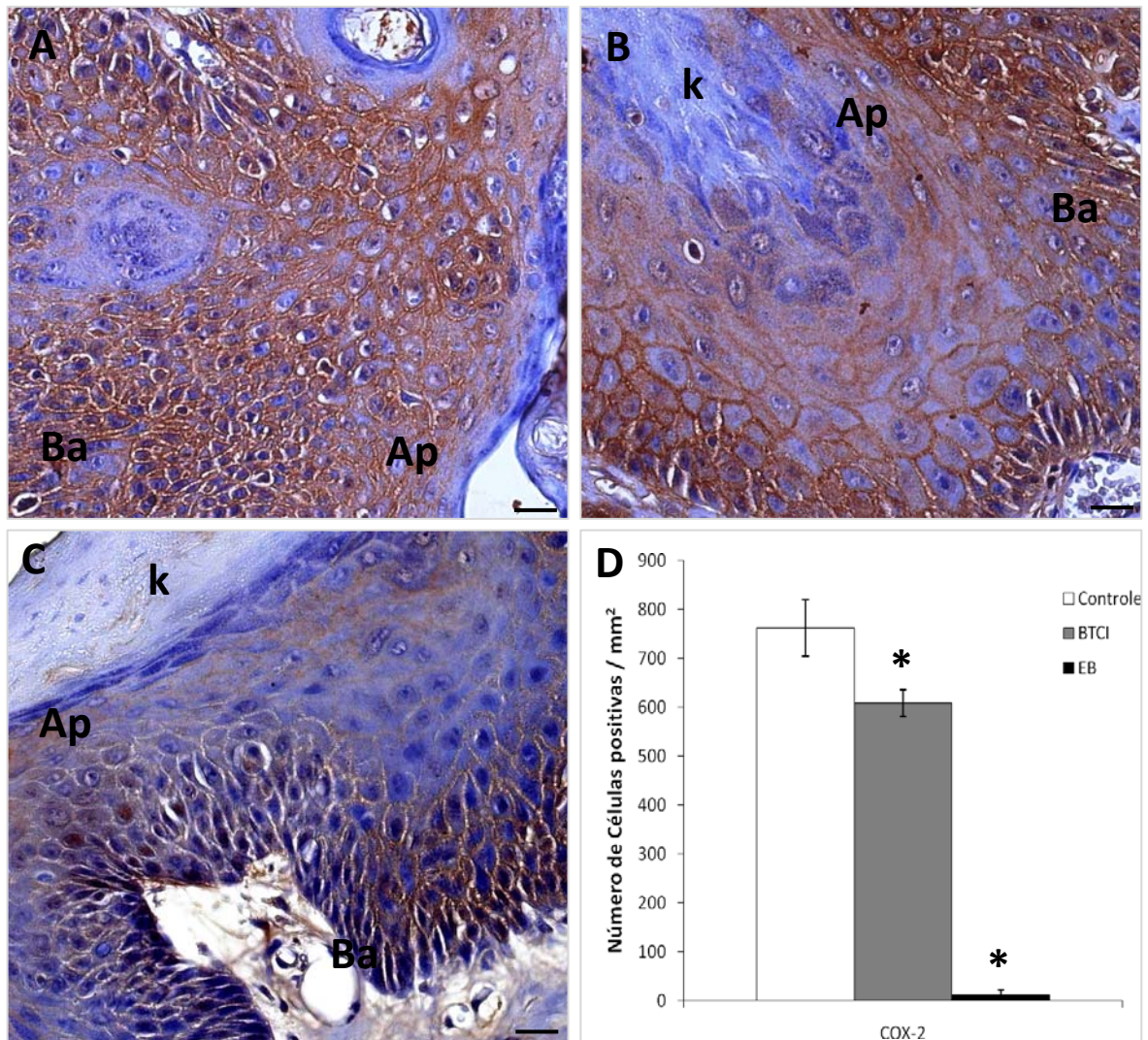
controle e uma tendência na redução das concentrações de PGE2 no grupo tratado com EB. No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas.



**Figura 23.** Detecção de cicloxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E2 (PGE2) por ELISA. Os dados estão expressos em unidades de absorbância e representados como média  $\pm$  erro padrão. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos.

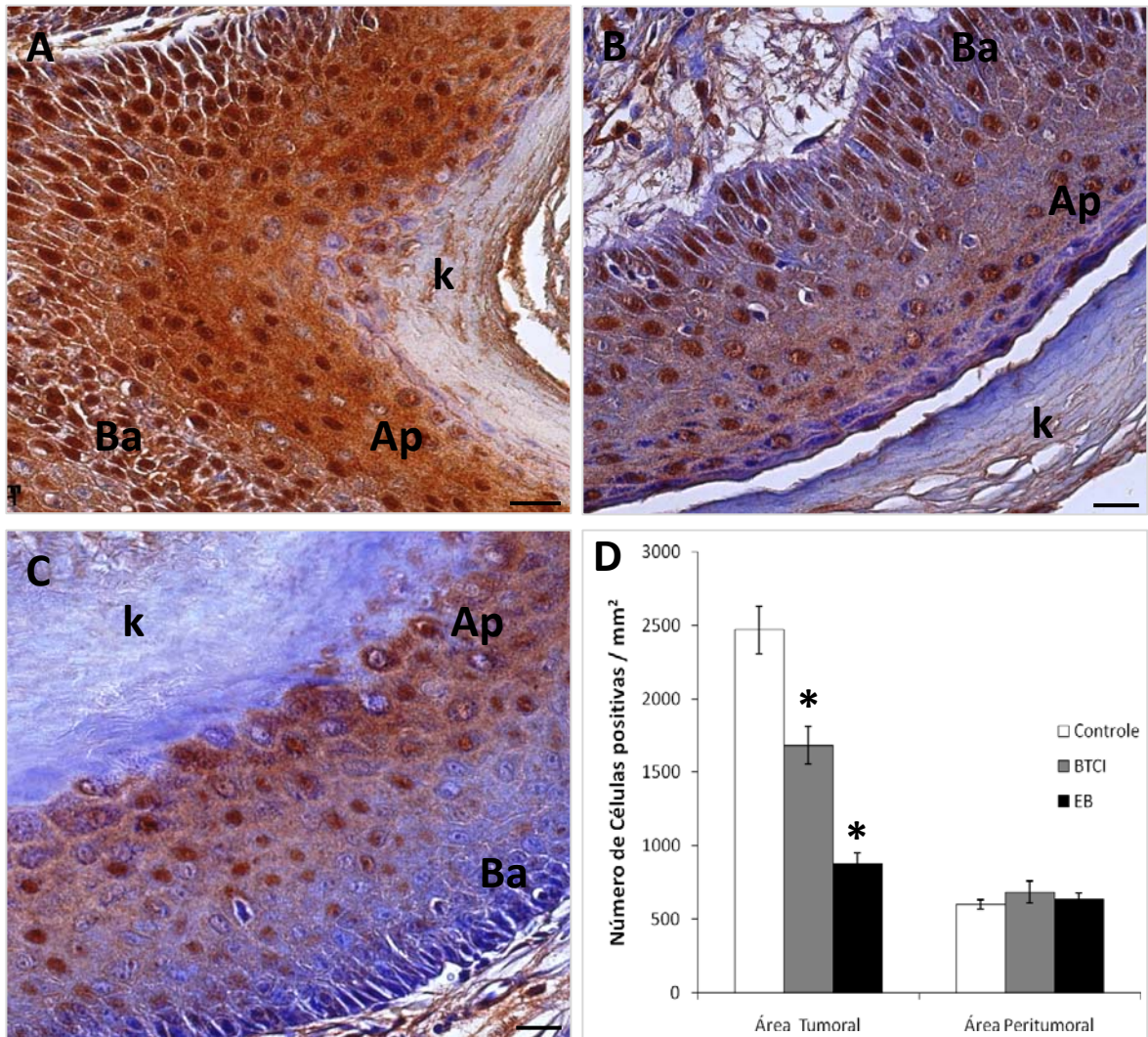
Decidiu-se então analisar a presença de COX-2 e PGE2 em regiões próximas e no local de lesões pré-malignas utilizando-se a técnica de imunohistoquímica (Figura 24). Não foi possível detectar PGE2 nas secções histológicas. A marcação para COX-2 foi observada principalmente na periferia citoplasmática de células da epiderme. O número de células positivas para COX-2 foi significativamente menor para o grupo tratado com BTCl, quando comparado com o controle. A contagem do número de células positivas para COX-2 no grupo tratado com EB foi significativamente reduzida mostrando apenas algumas marcações na porção basal da epiderme (Figura 24).





**Figura 24.** Imunohistoquímica para o marcador de cicloxigenase-2 (COX-2). Os camundongos (n=6) receberam indução química de câncer de pele não-melanoma no dorso e aplicação tópica por 15 semanas com água destilada (A); solução aquosa de extrato bruto (B) ou solução aquosa de BTCI (C). Marcações positivas estão representadas com a coloração marrom. Ba: região basal da epiderme; Ap: região apical da epiderme; k: camada de queratina. Barra = 20  $\mu$ m. D) Comparação do número de células positivas entre os grupos. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle.

O marcador de proliferação celular Ki-67 foi observado nos núcleos das células localizadas na epiderme e também em regiões da derme próximas às lesões pré-malígnas (peritumoral). O grupo controle apresentou marcações positivas intensas em todas as camadas da epiderme. O grupo tratado com BTCI também mostra marcações positivas em células localizadas tanto na camada mais basal quanto na apical, porém com menor intensidade e freqüência. Já o grupo tratado com EB mostra marcações positivas menos freqüentes e localizadas principalmente na região mais apical da epiderme (Figura 25). A contagem de células positivas para Ki-67 nas regiões peritumorais foi baixa e não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 25D).



**Figura 25.** Imunohistoquímica para o marcador de proliferação celular Ki-67. Os camundongos (n=6) receberam indução química de câncer de pele não-melanoma no dorso e aplicação tópica por 15 semanas com água destilada (A); solução aquosa de extrato bruto (B) ou solução aquosa de BTCI (C). Marcações positivas estão representadas com a coloração marrom. Ba: região basal da epiderme; Ap: região apical da epiderme; k: camada de queratina. Barra = 20  $\mu$ m. D) Comparação do número de células positivas entre os grupos. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle.



### 5.3 Agregação e encapsulação de BTCl em nanoestruturas

#### 5.3.1 Agregação do BTCl

Antes de iniciar os testes de encapsulação do BTCl em nanoestruturas, algumas características relacionadas ao processo de agregação do BTCl em diferentes condições de concentração e pH foram estudadas. A tabela 5 mostra a alteração no diâmetro hidrodinâmico das moléculas de BTCl (200  $\mu$ M) quando dispersas em diversas soluções.

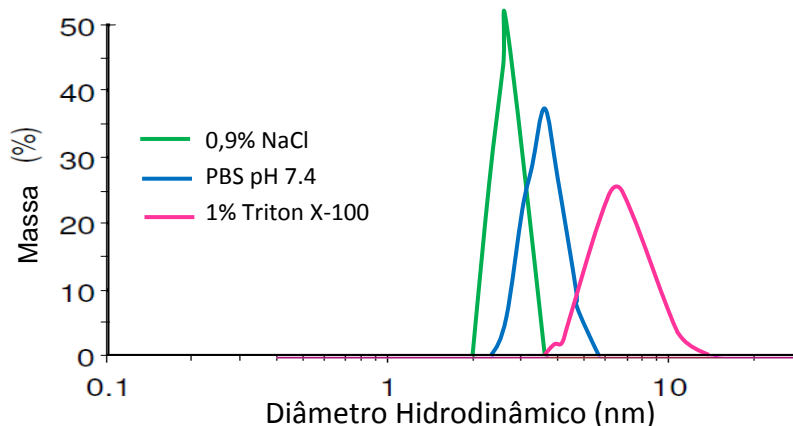
**Tabela 5.** Diâmetro hidrodinâmico de moléculas de BTCl (200  $\mu$ M) diluídas em diferentes soluções.

Solução	Diâmetro hidrodinâmico (nm)
Água deionizada	< 10 nm
NaCl 0,9 %	< 10 nm
PBS pH 7,4	< 10 nm
Triton X-100 1 % (15 mM)	< 10 nm
Tampão Acetato pH 4,0	> 10 nm
Desoxicolato de Sódio (15 mM)	> 10 nm

O tamanho teórico estimado para o eixo maior do monômero de BTCl é em torno de 2 nm (SILVA et al., 2005). No entanto, esse diâmetro aumenta quando o mesmo é medido em solução aquosa, devido a formação de camadas de solvatação envolvendo a proteína. Nessas condições, o tamanho medido recebe a denominação de diâmetro hidrodinâmico. Portanto, nesse experimento, moléculas de BTCl com diâmetros hidrodinâmicos menores que 10 nm foram considerados estar nas formas oligoméricas, e os diâmetros maiores que 10 nm, na forma agregada.

Amostras de BTCl dispersas em tampão pH 4 ou na solução contendo o detergente aniônico desoxicolato de sódio apresentaram diâmetros hidrodinâmicos

maiores que 10 nm, enquanto que o mesmo não foi observado nas outras soluções avaliadas (Tabela 5). A figura 26 mostra, com mais detalhes, a distribuição do diâmetro hidrodinâmico da população de BTCI dispersa em soluções que não induziram o processo de agregação.



**Figura 26.** Diâmetro hidrodinâmico de moléculas de BTCI (200  $\mu$ M) diluídas em diferentes soluções.

Não é possível avaliar com precisão o diâmetro hidrodinâmico de proteínas dispersas em soluções mais complexas como meio de cultura de células, uma vez que outras moléculas presentes no meio podem ser detectadas pelo equipamento e confundir a interpretação dos dados. Nesse caso, a microscopia de luz com contraste de fase pode ser usada como alternativa possibilitando a observação de agregados de BTCI com diâmetros iguais ou maiores que 200 nm. A formação de agregados de BTCI (200  $\mu$ M) em meio de cultura DMEM, acrescido ou não de soro fetal bovino, foi comparada (Tabela 6). Observou-se que a agregação do BTCI no meio de cultura ocorreu em 24 horas e manteve-se até 72 horas (último tempo avaliado). O processo de agregação não foi observado nas soluções de água deionizada ou PBS, mas ocorreu em DMEM independente da presença do soro fetal bovino (Tabela 6).

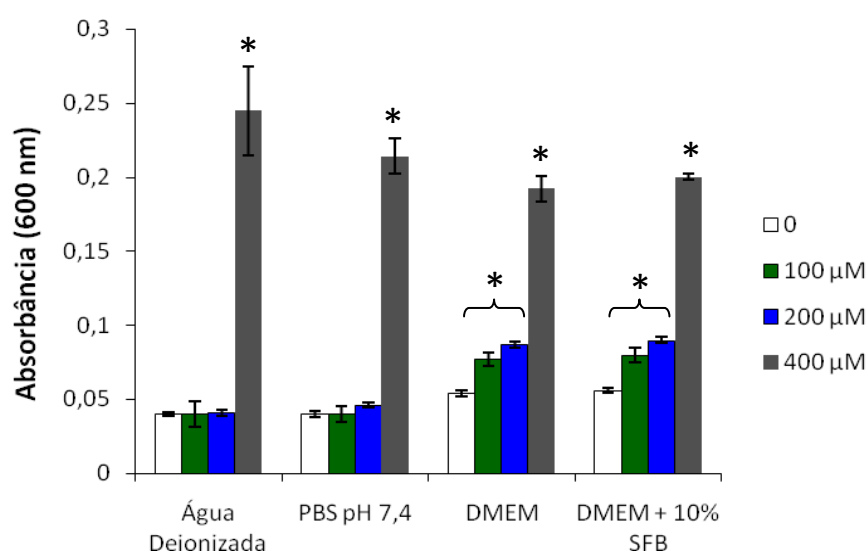
**Tabela 6.** Presença de agregados de BTCI (200  $\mu\text{M}$ ) diluído em diferentes soluções. Avaliação foi feita em microscópio invertido de contraste de fase.

	Presença de Agregados		
	24 horas	48 horas	72 horas
DMEM <sup>a</sup> + 10% SFB <sup>b</sup>	sim	sim	sim
DMEM <sup>a</sup>	sim	sim	sim
PBS pH 7,4	não	não	não
Água deionizada	não	não	não

<sup>a</sup> DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio de cultura).

<sup>b</sup> SFB: Soro Fetal Bovino.

Outra forma de avaliar agregação de macromoléculas ou partículas em solução é pela análise de turbidez (ZHANG et al., 2009). Na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , a turbidez nas amostras de DMEM, acrescido ou não de soro fetal bovino, aumentou significativamente em relação à água deionizada (Figura 27). Em contrapartida, na concentração de 400  $\mu\text{M}$ , observou-se a formação de agregados em todas as soluções avaliadas, inclusive quando BTCI estava disperso em água deionizada ou PBS, sugerindo que o processo de agregação do BTCI também ocorre de forma dose-dependente.



**Figura 27.** Detecção de agregados de BTCI diluído em diferentes soluções. Diferentes concentrações de BTCI foram diluídas e incubadas por 2 horas em água deionizada; PBS pH 7,4; meio de cultura (DMEM); ou meio de cultura com soro fetal bovino (DMEM + 10% SFB). A presença de agregados foi indicada pela turbidez das amostras a 600 nm. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,05$  comparado com a respectiva solução sem adição de BTCI.

### 5.3.2 Associação do BTCl com micelas de PEG-PE

A formação de agregados do BTCl em PBS e em meio de cultura foi avaliada na presença de micelas do copolímero PEG<sub>2000</sub>-PE. Primeiramente, observou-se que o diâmetro hidrodinâmico de BTCl disperso em PBS contendo diferentes concentrações de PEG<sub>2000</sub>-PE se manteve em torno de 8 nm, ou seja, se encontrava em um arranjo oligomérico (Tabela 7).

**Tabela 7.** Diâmetro hidrodinâmico de moléculas de BTCl (200 µM) diluídas em PEG<sub>2000</sub>-PE após 2 horas. Os dados estão representados como média ± erro padrão.

Concentração de PEG <sub>2000</sub> -PE <sup>a</sup>	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
0,1 mM	8,7 ± 4,5
0,5 mM	8,3 ± 4,1
1,0 mM	7,5 ± 2,3

<sup>a</sup> Soluções de PEG<sub>2000</sub>-PE foram preparadas em PBS pH 7,4.

Em seguida, a formação de agregados de BTCl em meio de cultura na presença de PEG<sub>2000</sub>-PE foi examinada em microscópio de luz (Tabela 8). A partir da concentração de 0,1 mM de PEG<sub>2000</sub>-PE, não foram observados agregados de BTCl no meio de cultura.

**Tabela 8.** Presença de agregados de BTCl (200 µM) diluído em diferentes concentrações de PEG<sub>2000</sub>-PE e incubados por 2 horas em tampão (PBS pH 7,4) ou meio de cultura (DMEM<sup>a</sup> + 10% SFB<sup>b</sup>). Avaliação foi feita em microscópio invertido de contraste de fase.

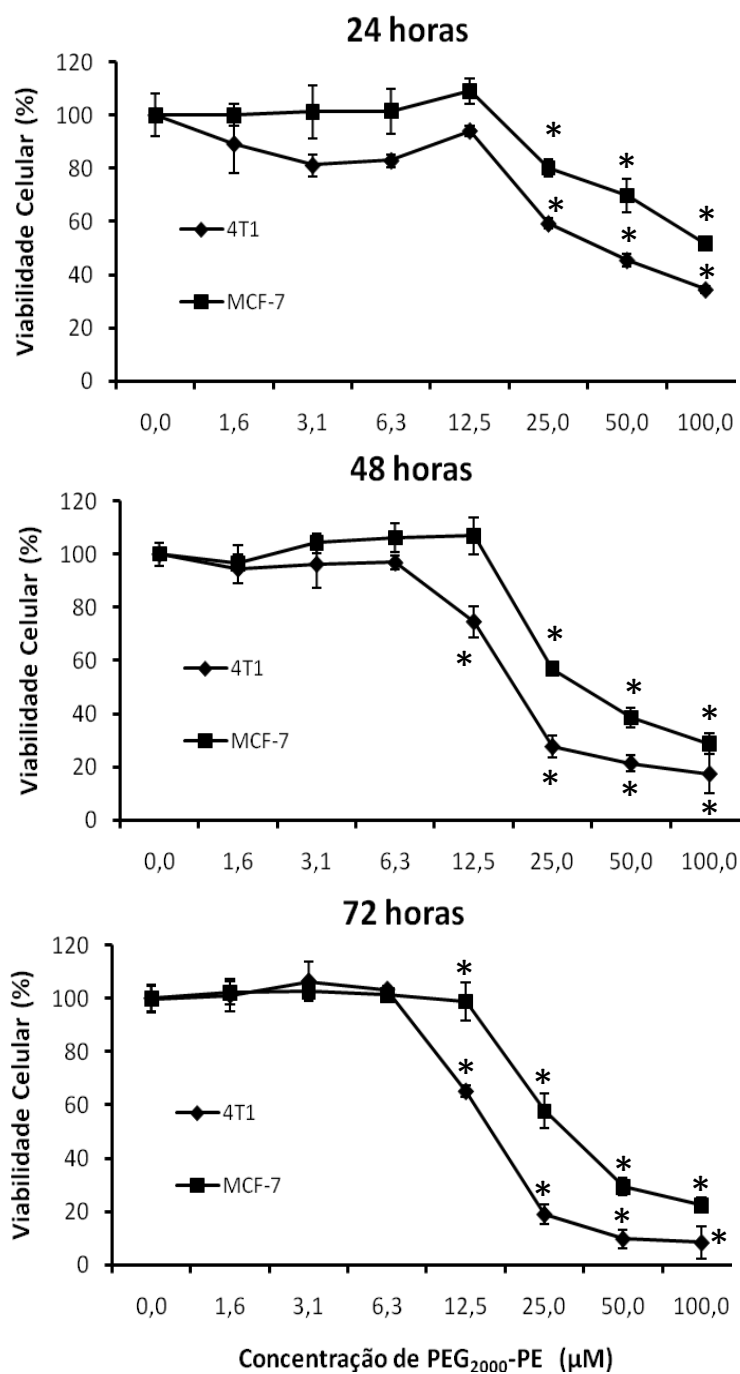
Concentração de PEG <sub>2000</sub> -PE	Presença de Agregados	
	PBS pH 7.4	DMEM <sup>a</sup> + 10% SFB <sup>b</sup>
0,0125 mM	Não	Sim
0,100 mM	Não	Não
0,500 mM	Não	Não
1,000 mM	Não	Não

<sup>a</sup> DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

<sup>b</sup> SFB: Soro Fetal Bovino.

Para determinar a concentração de PEG<sub>2000</sub>-PE mais adequada a ser utilizada nos próximos ensaios, a viabilidade de linhagens de câncer de mama incubadas com PEG<sub>2000</sub>-PE, sem a presença do BTCl, foi avaliada (Figura 28). PEG<sub>2000</sub>-PE reduz a viabilidade de células MCF-7 e 4T1 de maneira dose e tempo- dependente. As células MCF-7 são relativamente menos sensíveis ao PEG<sub>2000</sub>-PE quando comparadas com células 4T1. Após 72 horas, a viabilidade das células MCF-7 se manteve em torno de 90% na concentração de 12,5 µM de PEG<sub>2000</sub>-PE, enquanto que nessa mesma concentração a viabilidade das células 4T1 estava em torno de 60%.



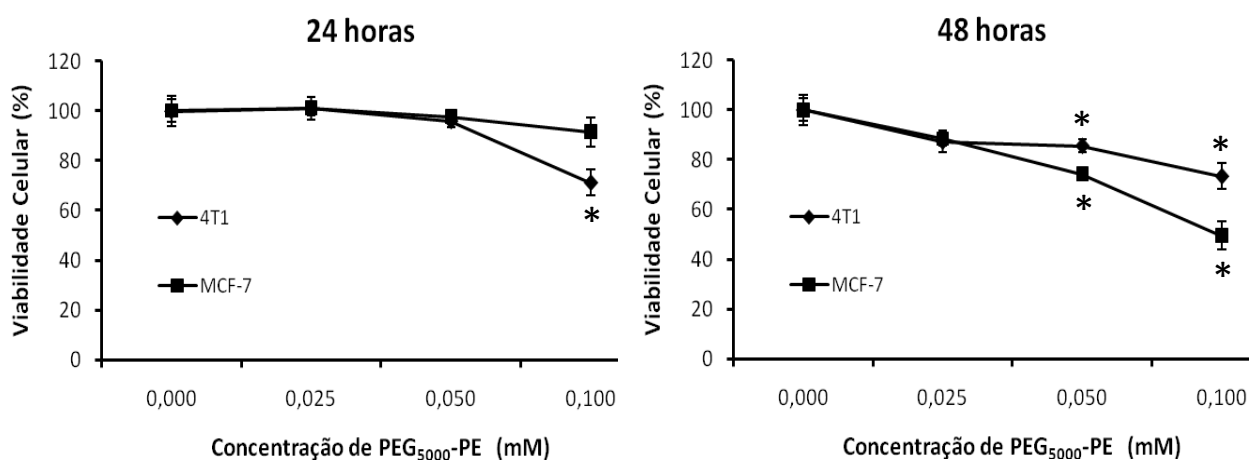


**Figura 28.** Efeito de PEG<sub>2000</sub>-PE na viabilidade celular. Células de duas linhagens de câncer de mama (MCF-7 e 4T1) foram incubadas com diferentes concentrações de PEG<sub>2000</sub>-PE por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média ± erro padrão. Teste de Scheffé, \* p < 0,001 comparado com o controle.

Devido à toxicidade das moléculas de PEG<sub>2000</sub>-PE em concentrações acima de 0,0125 mM, decidiu-se avaliar a formação de agregados de BTCl em meio de

cultura com a adição de uma outra molécula de PEG-PE que apresenta a porção polimérica mais longa, ou seja, a porção de PEG com massa molecular de 5000 Da, ao invés de 2000 Da. BTCl diluído em diferentes concentrações de PEG<sub>5000</sub>-PE apresentou mesmo padrão de formação de agregados observados para o PEG<sub>2000</sub>-PE (Tabela 8), ou seja, agregados de BTCl só foram observados em meio de cultura a partir de concentrações abaixo de 0,1 mM de PEG<sub>5000</sub>-PE.

A análise da citotoxicidade de moléculas de PEG<sub>5000</sub>-PE mostrou que esse copolímero é menos tóxico às células de câncer quando comparado com o PEG<sub>2000</sub>-PE, no entanto, ainda apresenta citotoxicidade após 48 horas de incubação com concentrações maiores que 0,025 mM (Figura 29).

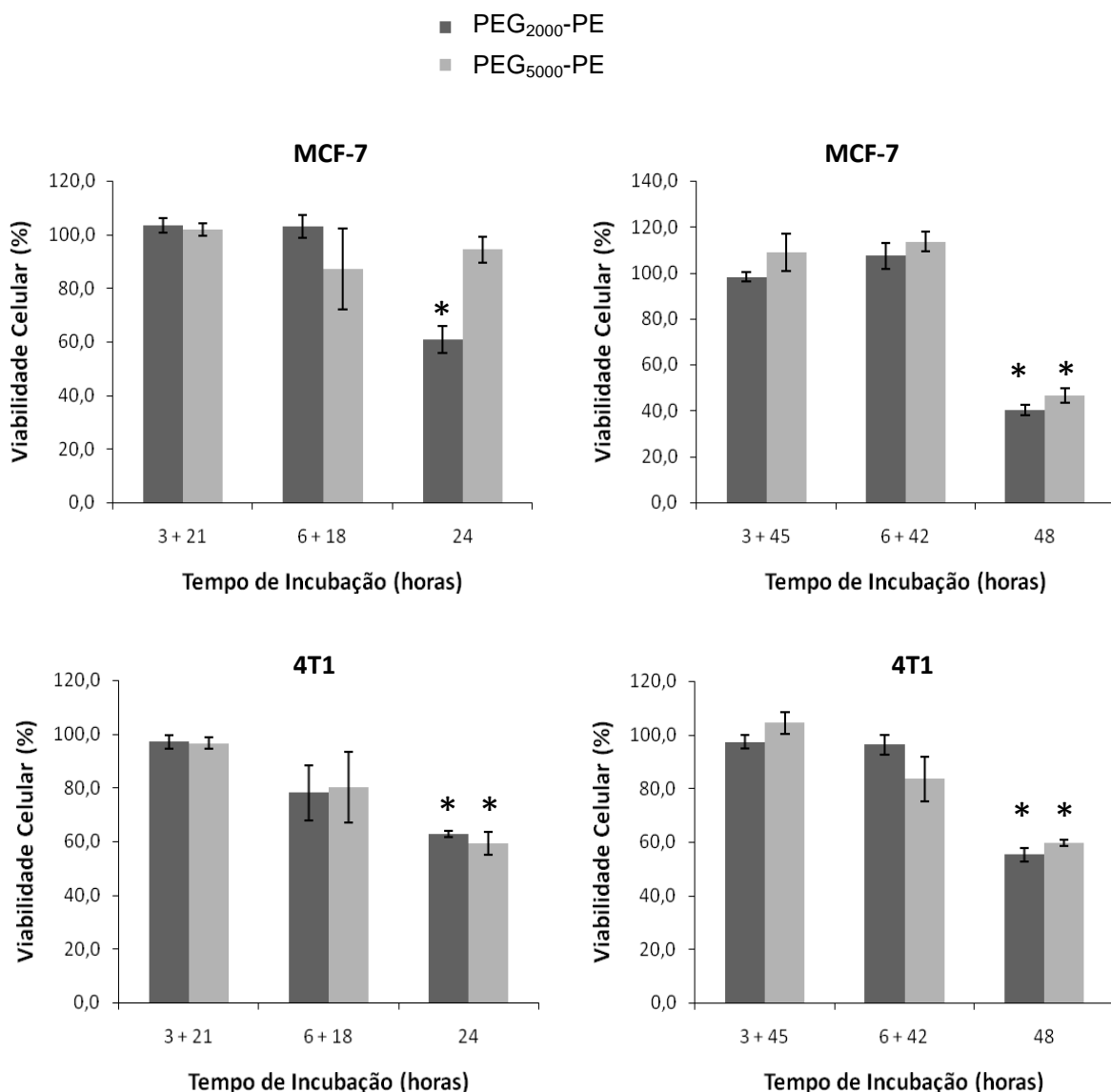


**Figura 29.** Efeito de PEG<sub>5000</sub>-PE na viabilidade celular. Células de duas linhagens de câncer de mama (MCF-7 e 4T1) foram incubadas com diferentes concentrações de PEG<sub>5000</sub>-PE por 24 e 48 horas. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média ± erro padrão. Teste de Scheffé, \* p < 0,001 comparado com o controle.

A concentração mínima de PEG-PE, seja de massa molecular de 2000 ou 5000 Da, necessária para que não ocorra a formação de agregados de BTCl em

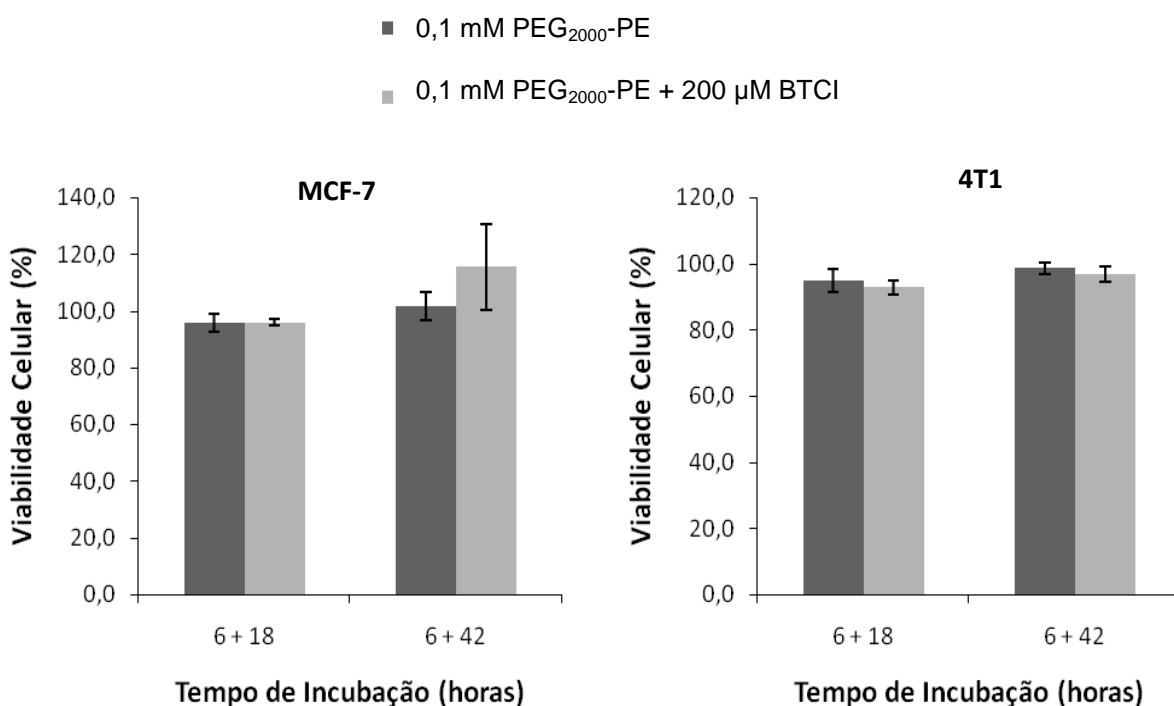
meio de cultura é de 0,1 mM. No entanto, essa concentração de PEG-PE afeta significativamente a viabilidade

das células tumorais. Decidiu-se então testar a toxicidade de ambas as moléculas de PEG-PE, mantendo a concentração de 0,1 mM e reduzindo o tempo de incubação (Figura 30).



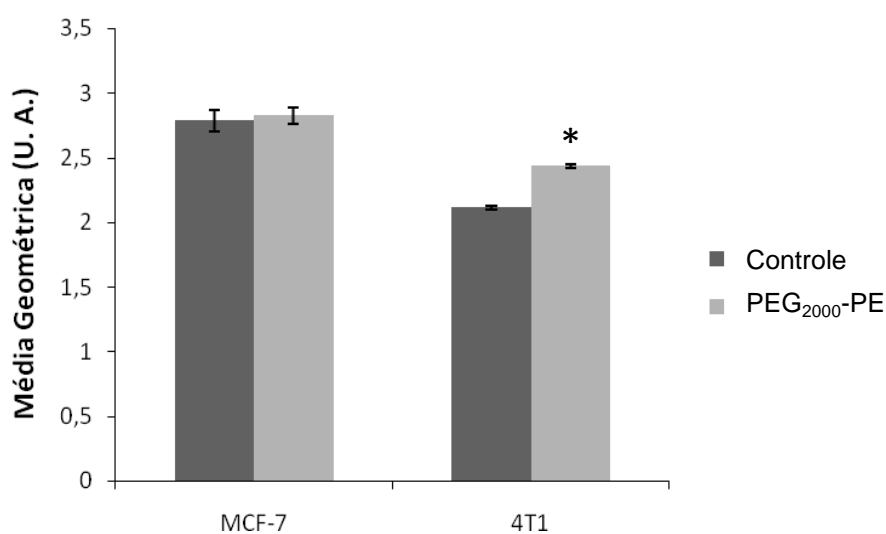
**Figura 30.** Efeito de PEG<sub>2000</sub>-PE e PEG<sub>5000</sub>-PE na viabilidade celular. Células de duas linhagens de câncer de mama (MCF-7 e 4T1) foram incubadas com 0,1 mM de PEG<sub>2000</sub>-PE ou PEG<sub>5000</sub>-PE por diferentes tempos: remoção de PEG-PE após 3 horas e incubação com meio de cultura até completar o total de 24 ou 48 horas (3 + 21 horas ou 3 + 45 horas); remoção do PEG-PE após 6 horas e incubação com meio de cultura até completar o total de 24 ou 48 horas (6+ 18 horas ou 6 + 42 horas). A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média ± erro padrão. Teste de Scheffé, \* p < 0,001 comparado com o controle.

A remoção de 0,1 mM de PEG-PE (2000 ou 5000) após 6 horas e a incubação com meio de cultura até completar o total de 24 ou 48 horas não reduziu significativamente a viabilidade das linhagens tumorais, quando comparado com a incubação direta de PEG-PE por 24 ou 48 horas. Sendo assim, decidiu-se utilizar o PEG<sub>2000</sub>-PE para os testes seguintes, uma vez que sua utilização como carreador de fármacos está melhor estabelecida na literatura. Os efeitos citotóxicos do BTCI associado a 0,1 mM PEG<sub>2000</sub>-PE foram então analisados contra células MCF-7 e 4T1, seguindo o regime de remoção das amostras após 6 horas e incubação com meio de cultura até completar o total de 24 ou 48 horas (Figura 31).



**Figura 31.** Efeito de BTCI associado a PEG<sub>2000</sub>-PE na viabilidade celular. Células de duas linhagens de câncer de mama (MCF-7 e 4T1) foram incubadas com 0,1 mM de PEG<sub>2000</sub>-PE ou 0,1 mM de PEG<sub>2000</sub>-PE associados a 200 µM BTCI por diferentes tempos: remoção de PEG-PE após 6 horas e incubação com meio de cultura até completar o total de 24 ou 48 horas (6+ 18 horas ou 6 + 42 horas). A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média ± erro padrão. Teste de Scheffé; não houve diferença significativa entre as amostras.

Nenhum efeito citotóxico significativo foi observado após o tratamento das células tumorais com BTCl associado a PEG<sub>2000</sub>-PE. É possível que o tempo curto de incubação com as amostras (6 horas) não foi suficiente para permitir a associação / internalização de uma concentração adequada do BTCl pelas células. A interação de PEG<sub>2000</sub>-PE a células MCF-7 e 4T1 foram então investigadas (Figura 32).

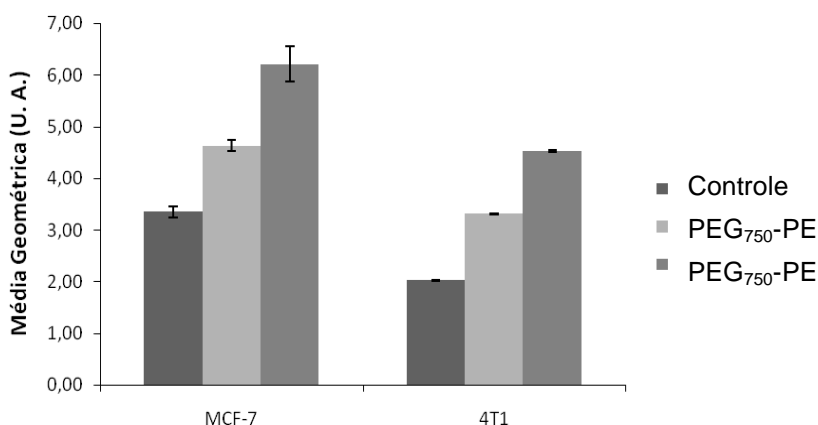


**Figura 32.** Interação de PEG<sub>2000</sub>-PE com células tumorais. Células de duas linhagens de câncer de mama (MCF-7 e 4T1) foram incubadas com 0,1 mM de PEG<sub>2000</sub>-PE (marcado com rodamina B). A associação das micelas de PEG<sub>2000</sub>-PE às células foi analisada por citometria de fluxo após 6 horas de incubação. Os dados estão expressos em média geométrica e representados como média ± erro padrão. Teste de Scheffé, \* p < 0,001 comparado ao seu respectivo controle.

Não foi observada interação expressiva de PEG<sub>2000</sub>-PE às células MCF-7, o que pode estar relacionado com a ausência de efeito citotóxico após a incubação de PEG<sub>2000</sub>-PE + BTCl nessa linhagem. Em contrapartida, houve uma discreta associação de PEG<sub>2000</sub>-PE com as células 4T1, mas não houve a indução de efeito citotóxico pelo BTCl, como observado na figura 31.

Para tentar aumentar a associação das micelas com as células e, conseqüentemente, aumentar a concentração de BTCl entregue, duas estratégias foram empregadas. A primeira estratégia consistiu na inclusão de um peptídeo catiônico (TAT), conhecido por estimular a associação de nanoestruturas com células, na formulação das micelas. Para que o peptídeo TAT atue de forma eficiente é importante que ele esteja exposto na superfície da micela. Como no momento o peptídeo TAT conjugado a PEG<sub>1000</sub>-PE não estava disponível, foi necessário mudar a composição principal das micelas para um co-polímero com a porção polimérica de massa molecular menor que 1000 Da: o PEG<sub>750</sub>-PE.

Inicialmente, a associação das micelas de PEG<sub>750</sub>-PE, com ou sem TAT, foi avaliada após 6 horas de incubação (Figura 33). A associação de micelas de PEG<sub>750</sub>-PE foi maior quando comparada com micelas de PEG<sub>2000</sub>-PE. Ainda assim, a inclusão de TAT na formulação mostrou a melhor associação das micelas em ambas as linhagens.



**Figura 33.** Associação de PEG<sub>750</sub>-PE e PEG<sub>750</sub>-PE TAT às células. Células de duas linhagens de câncer de mama (MCF-7 e 4T1) foram incubadas com 0,1 mM de PEG<sub>750</sub>-PE (marcado com rodamina B) conjugados ou não ao peptídeo TAT. A associação das micelas às células foi analisada por citometria de fluxo após 6 horas de incubação. Os dados estão expressos em média geométrica e representados como média ± erro padrão. Teste de Scheffé, \* p < 0,001 comparado ao seu respectivo controle.

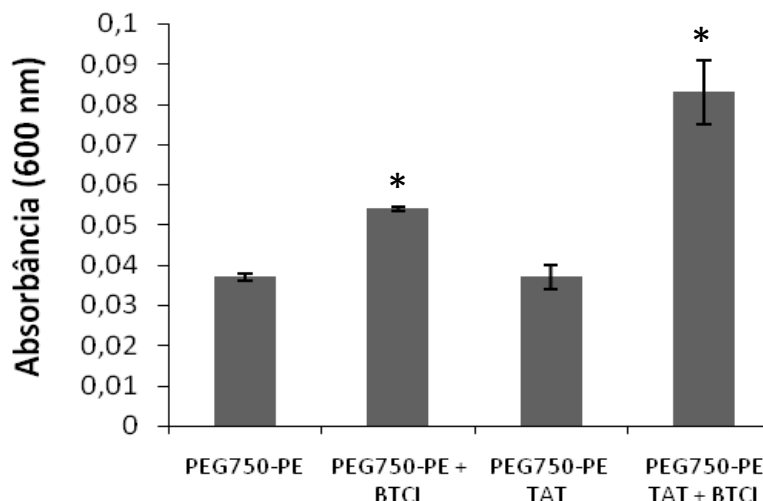
A formação de agregados de BTCI na presença de PEG<sub>750</sub>-PE, com ou sem TAT, também foi examinada por microscopia de luz e turbidez (Tabela 9 e Figura 34). Como agregados de BTCI foram encontrados após incubação com PEG<sub>750</sub>-PE, decidiu-se testar uma segunda estratégia para melhorar a associação das micelas com as células: a adição de anticorpos na superfície das micelas.

**Tabela 9.** Presença de agregados de BTCI (200 µM) diluído em PEG<sub>750</sub>-PE ou PEG<sub>750</sub>-PE com o peptídeo TAT e incubados por 2 horas em tampão (PBS; pH 7,4) ou meio de cultura (DMEM<sup>a</sup> + 10% SFB<sup>b</sup>). Avaliação foi feita em microscópio invertido de contraste de fase.

	Presença de Agregados	
	PBS pH 7.4	DMEM <sup>a</sup> + 10% SFB <sup>b</sup>
0,1 mM PEG <sub>750</sub> -PE	não	não
0,1 mM PEG <sub>750</sub> -PE + 200 µM BTCI	sim	sim
0,1 mM PEG <sub>750</sub> -PE TAT	não	não
0,1 mM PEG <sub>750</sub> -PE TAT + 200 µM BTCI	sim	sim

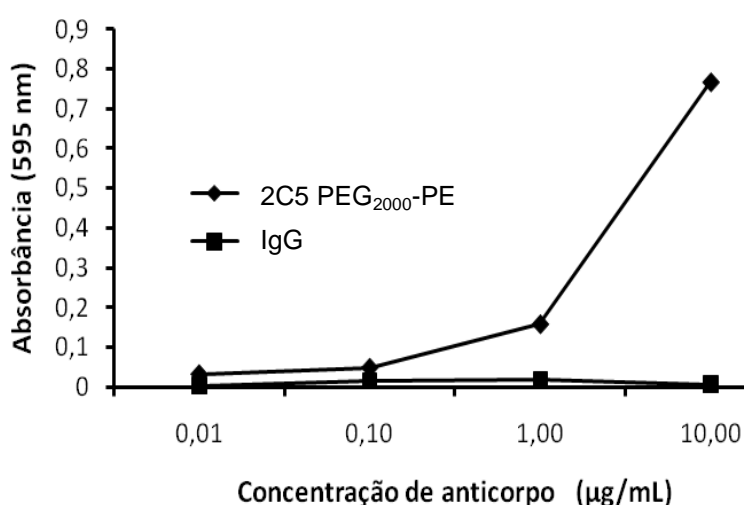
<sup>a</sup> DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

<sup>b</sup> SFB: Soro Fetal Bovino.



**Figura 34.** Detecção de agregados de BTCI quando diluído em PEG<sub>750</sub>-PE. BTCI (200 µM) foi diluído em 0,1 mM de PEG<sub>750</sub>-PE ou PEG<sub>750</sub>-PE com o peptídeo TAT e incubado por 2 horas. As soluções de PEG<sub>750</sub>-PE foram preparadas em PBS pH 7,4. A presença de agregados foi indicada pela turbidez das amostras a 600 nm. Os dados estão representados como média ± erro padrão. Teste de Scheffé, \* p < 0,001 comparado com as respectivas amostras sem BTCI.

O anticorpo 2C5 foi escolhido para ser conjugado na superfície das micelas de PEG-PE para facilitar sua interação com as células. Portanto, ele foi conjugado ao PEG<sub>3400</sub>-PE e, posteriormente, adicionado às micelas de PEG<sub>2000</sub>-PE. Após o processo de preparação das imunomicelas, a atividade específica no reconhecimento do anticorpo 2C5 foi avaliada pelo método de ELISA, mostrando que o anticorpo ainda estava ativo (Figura 35).



**Figura 35.** ELISA de imunomicelas 2C5. A afinidade do anticorpo 2C5 por nucleossomos foi avaliada após sua incorporação em micelas de PEG<sub>2000</sub>-PE. O anticorpo IgG foi usado como controle negativo.

A formação de agregados de BTCl na presença das imunomicelas foi avaliada por microscopia de luz. Apesar da presença de alguns poucos agregados (Tabela 10), a citotoxicidade das imunomicelas associadas ao BTCl foi avaliada. No entanto, nenhuma redução significativa na viabilidade de células de câncer de mama foi observada após o tratamento (Figura 36). Células MCF-7 tratadas com imunomicelas apresentaram um ligeiro aumento na viabilidade celular.

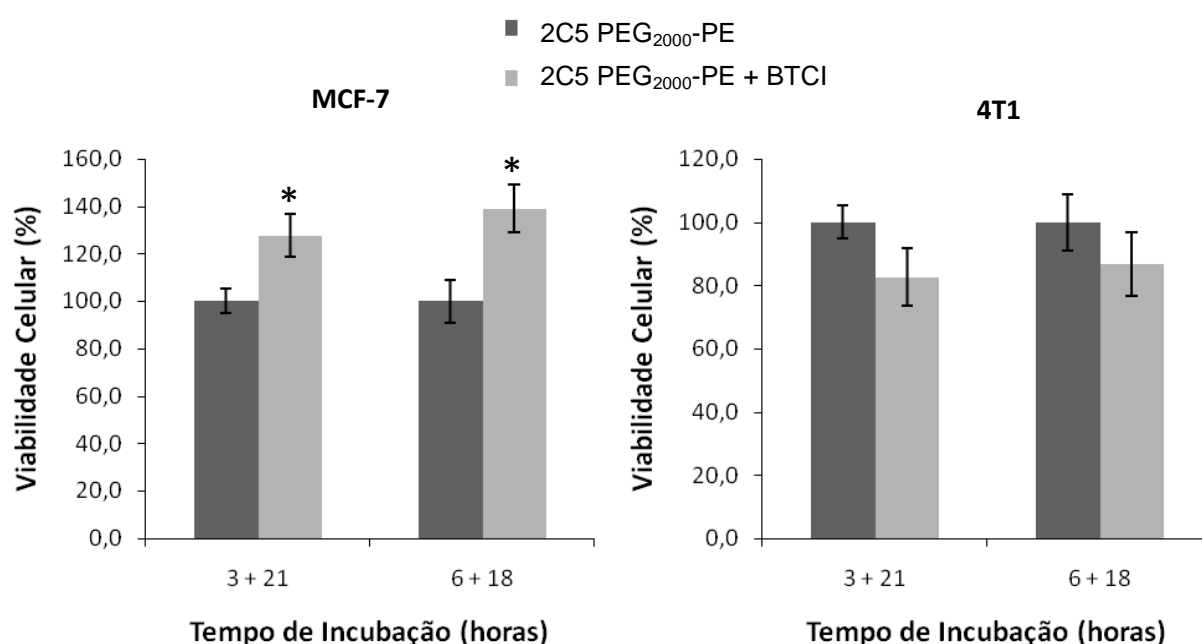


**Tabela 10.** Presença de agregados de BTCl (200  $\mu$ M) diluído em PEG<sub>2000</sub>-PE conjugado ao anticorpo 2C5 e incubados por 2 horas em tampão (PBS pH 7,4) ou meio de cultura (DMEM<sup>a</sup> + 10% SFB<sup>b</sup>). Avaliação foi feita em microscópio invertido de contraste de fase.

	Presença de Agregados	
	PBS pH 7.4	DMEM <sup>a</sup> + 10% SFB <sup>b</sup>
0,1 mM PEG <sub>2000</sub> -PE 2C5	não	não
0,1 mM PEG <sub>2000</sub> -PE 2C5 + 200 $\mu$ M BTCl	não	sim (poucos)

<sup>a</sup> DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

<sup>b</sup> SFB: Soro Fetal Bovino.



**Figura 36.** Efeito de BTCl associado a PEG<sub>2000</sub>-PE 2C5 na viabilidade celular. Células de duas linhagens de câncer de mama (MCF-7 e 4T1) foram incubadas com 0,1 mM de PEG<sub>2000</sub>-PE com o anticorpo 2C5 ou 0,1 mM de PEG<sub>2000</sub>-PE com o anticorpo 2C5 associado a 200  $\mu$ M BTCl por diferentes tempos: remoção de PEG-PE após 3 ou 6 horas e incubação com meio de cultura até completar o total de 24 ou 48 horas (6+ 18 horas ou 6 + 42 horas). A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado com as respectivas amostras sem BTCl.

### 5.3.3 Encapsulação do BTCl em lipossomos

Decidiu-se então tentar encapsular o BTCl em nanoestruturas com dimensões maiores que as micelas visando aumentar a concentração de BTCl

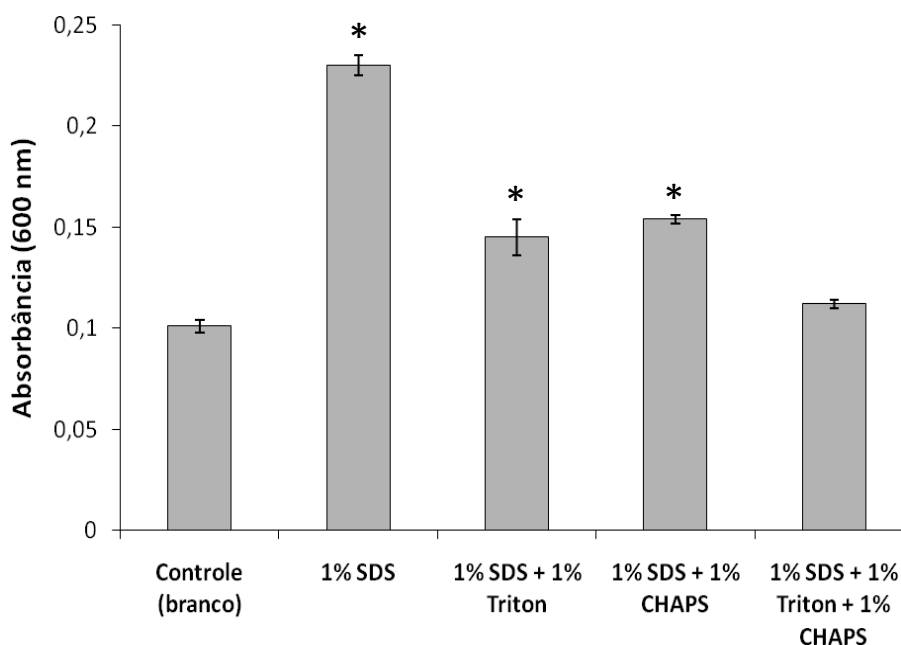
encapsulada e, conseqüentemente, entregue na célula. Nanoestruturas lipossomais foram selecionadas para esse propósito. Experimentos preliminares foram realizados para a padronização do protocolo de produção e caracterização de BTCI lipossomais. Para a dosagem de lipídios foram testados os protocolos de Stewart e um kit enzimático específico para dosagem de fosfolipídios. Ambos os protocolos forneceram resultados precisos e satisfatórios (dados não mostrados). Porém decidiu-se usar o kit enzimático, pois além de detectar fosfolipídios em amostras de lipossomos diluídas, não é necessário a manipulação de solventes e outros reagentes tóxicos como ocorre no método de Stewart.

Para separar BTCI encapsulado de BTCI não encapsulado três metodologias foram testadas: cromatografia de exclusão molecular; diálise e filtração/centrifugação (Tabela 11). A cromatografia de exclusão molecular é eficiente, no entanto, as amostras são diluídas em torno de 10 vezes (varia com o comprimento da coluna) ao término da separação. A diálise também é eficiente, não altera significativamente a concentração de lipídios das amostras, mas requer em torno de 16 horas para concluir o processo. O método de separação de BTCI não encapsulado com um filtro revestido por uma membrana, com poros de exclusão de 100 kDa (Microcon), submetido à centrifugação, mostrou eficiência semelhante à diálise em um tempo menor que nos outros métodos. Portanto, o método de separação escolhido foi o de filtração/centrifugação.

**Tabela 11.** Comparação de métodos para separação de BTCI não encapsulado em formulações lipossomais.

<b>Métodos</b>	<b>Material</b>	<b>Tempo</b>	<b>Desvantagem</b>
Exclusão molecular	Sepharose 4B - CL	60 minutos	Amostra muito diluída
Diálise	Membrana 300 kDa	16 horas	Longo período
Filtração /Centrifugação	Membrana 100 kDa/Microcon	30-40 minutos	Diluição da amostra

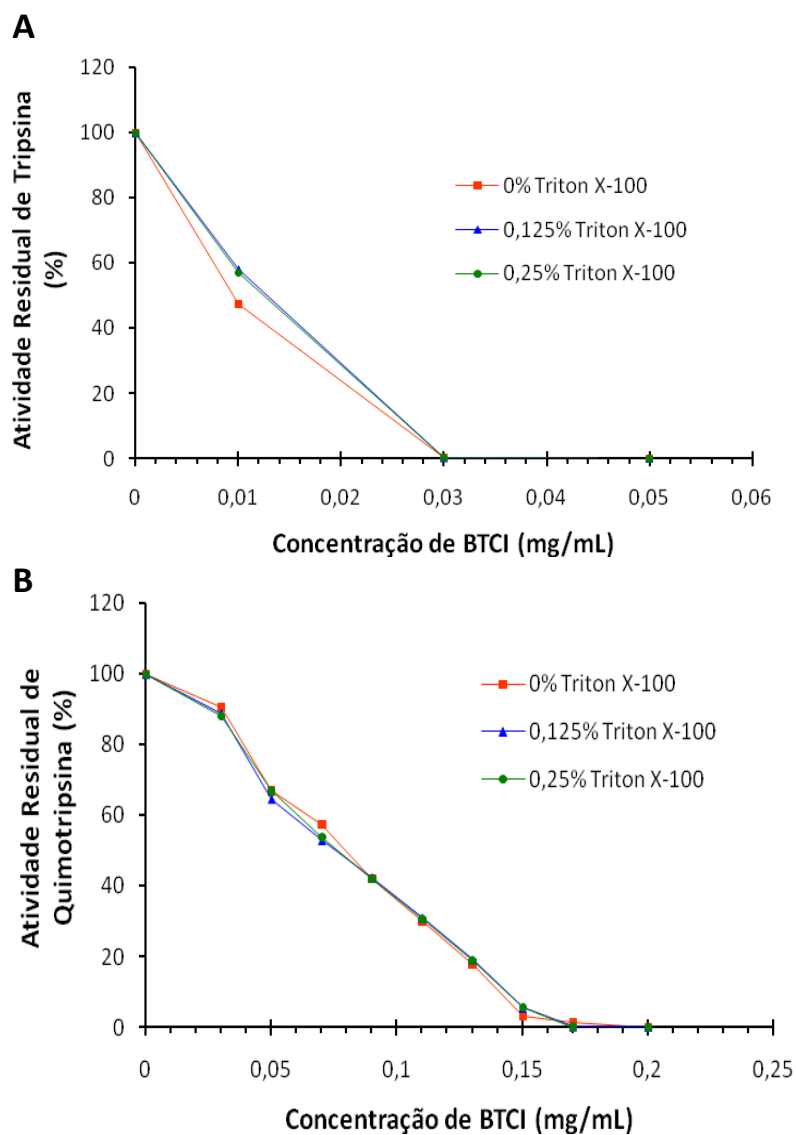
Para dosar a quantidade de BTCI encapsulado em lipossomos, diferentes variações do método de dosagem de proteínas de Lowry foram testadas. Apesar do método de Lowry conter SDS na composição de um de seus reagentes, a concentração de detergente empregada não é suficiente para romper completamente os lipossomos, como é observado pelo aumento da turbidez das amostras (Figura 37). Já a adição dos detergentes CHAPS e Triton X-100 ao método melhorou significativamente o rompimento dos lipossomos, restaurando a turbidez para valores próximos aos do controle (branco) e permitindo uma dosagem mais precisa da concentração de BTCI encapsulado.



**Figura 37.** Interferência dos lipossomos no método de dosagem de proteínas de Lowry. Amostras de lipossomos vazios foram incubadas com diferentes combinações de detergentes durante o método de Lowry. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado com a com a solução controle (branco).

Para determinar a atividade de inibição de proteases pelo BTCI encapsulado em lipossomos é necessário romper os lipossomos com a menor concentração de detergente possível para que a estrutura do inibidor e a atividade inibitória não sejam

afetadas. Observou-se que as duas concentrações do detergente Triton X-100 testadas não afetaram a atividade inibitória do BTCl (Figura 38). Portanto, optou-se por usar a maior concentração (0,25%) de Triton X-100 para os ensaios seguintes.



**Figura 38.** Interferência da adição de detergente na determinação da atividade inibitória de BTCl encapsulado em lipossomos. Amostras de lipossomos vazios foram incubadas com diferentes concentrações de Triton X-100 e atividade inibitória foi comparada com amostras controle (sem adição de detergente). A) Inibição de tripsina. B) Inibição de quimotripsina.

Com os métodos de caracterização dos lipossomos padronizados, tentativas de encapsulação do BTCI em lipossomos, por meio do método clássico de hidratação do filme lipídico (HFL) e o método de remoção de detergente, como detalhado na Tabela 12, foram testadas.

**Tabela 12.** Composição de formulações lipossomais de BTCI.

Formulação	Composição	Razão Molar (%)	Concentração de Lipídios Totais (mg/mL)	Concentração de BTCI ( $\mu\text{M}$ )	Lipídio: <i>n-Octyl glucoside</i> (razão molar)	Método
1	PC : CH : PEG <sub>2000</sub> -PE	65 : 30 : 5	5	200	-	HFL / Extrusão
2	PC : CH : PEG <sub>2000</sub> -PE	65 : 30 : 5	5	200	-	HFL / Sonicação
3	PC : CH : PEG <sub>2000</sub> -PE	65 : 30 : 5	5	200	1 : 5	Remoção de detergente
4	PC : CH : PEG <sub>2000</sub> -PE	65 : 30 : 5	5	200	1 : 1	Remoção de detergente

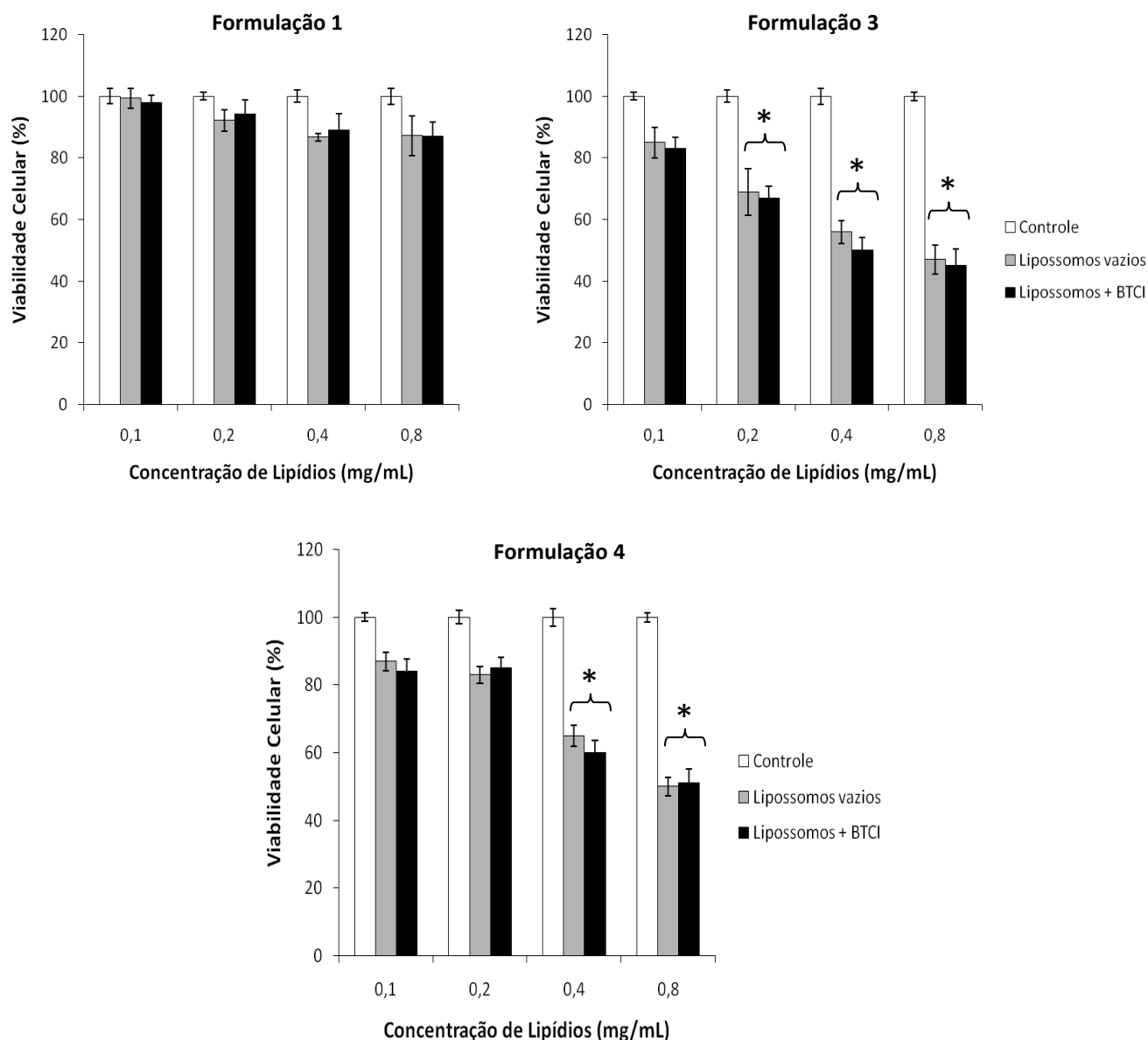
PC: fosfatidilcolina de ovo      CH: colesterol

O diâmetro hidrodinâmico dos lipossomos e a porcentagem de encapsulação foram determinados (Tabela 13). Todas as formulações apresentaram um diâmetro hidrodinâmico satisfatório em torno de 140 a 190 nm. No entanto, a porcentagem de encapsulação foi muito baixa, com exceção da formulação 4.

**Tabela 13.** Caracterização de formulações lipossomais de BTCI.

Formulação	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Porcentagem de encapsulação
1	186 $\pm$ 24	2 % ( 4 $\mu\text{M}$ )
2	130 $\pm$ 50	2 % ( 4 $\mu\text{M}$ )
3	119 $\pm$ 32	2,5 % (5 $\mu\text{M}$ )
4	149 $\pm$ 41	12,5 % (25 $\mu\text{M}$ )

A citotoxicidade dos lipossomos vazios ou encapsulando BTCI das formulações 1, 3 e 4 em células MCF-7 foi determinada (Figura 39). A amostra 2 foi descartada devido à presença de contaminantes.



**Figura 39.** Efeito de formulações lipossomais na viabilidade celular. Células de câncer de mama (MCF-7) foram incubadas por 24 horas com diferentes formulações lipossomais. A composição e métodos de encapsulação de cada formulação estão na tabela 12. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado com o grupo controle.

Lipossomos vazios da formulação 1 não induziram citotoxicidade significativa em células MCF-7 em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, lipossomos vazios das formulações 3 e 4 mostraram citotoxicidade significativa e dose-dependente. Resquícios de detergente usado nas formulações 3 e 4, presentes mesmo após diálise, podem ter sido responsáveis pela toxicidade significativa dos lipossomos vazios. Com relação ao BTCl lipossomal, não foi

observado nenhum efeito significativo na redução da viabilidade quando comparado ao respectivo lipossomo vazio (Figura 39).

Para as formulações lipossomais seguintes decidiu-se mudar os métodos de encapsulação e também simplificar a composição dos lipossomos para melhorar a eficiência desse processo. A presença de PEG<sub>2000</sub>-PE na composição lipossomal é fundamental para proteger os lipossomos contra o sistema retículo-endotelial e garantir maior tempo de circulação dos mesmos em tratamento *in vivo* (TORCHILIN, 2007). No entanto, sua presença está relacionada a reduções na porcentagem de encapsulação de compostos (COLLETIER et al., 2002). Dessa forma, como um dos primeiros objetivos desse trabalho era o de otimizar a encapsulação do BTC1 e estudar seus efeitos *in vitro*, optou-se por retirar o PEG<sub>2000</sub>-PE da composição lipossomal.

A porcentagem de encapsulação pode ser otimizada ajustando a concentração de lipídios; o método de encapsulação; o tampão utilizado; proporções de fosfolipídios e colesterol; e razão lipídios-proteína. Outra estratégia é a adição de fosfolipídios que apresentem maior afinidade pela proteína (COLLETIER et al., 2002). Considerando que o BTC1 tem ponto isoelétrico (pI) baixo, e que em pH 7 ele está carregado negativamente, a adição de fosfolipídios carregados positivamente pode favorecer a interação da proteína com os lipossomos. Além disso, fosfolipídios carregados positivamente favorecem a interação dos lipossomos com as células. A redução da força iônica do tampão também contribui para a interação da proteína com os lipossomos (COLLETIER et al., 2002), e por isso utilizou-se tampão PBS diluído 10 vezes para a encapsulação do BTC1. As variações nas formulações lipossomais e a caracterização das mesmas estão organizadas nas tabelas 14 e 15.

**Tabela 14.** Formulações lipossomais de BTCl e porcentagem de encapsulação.

Composição	Razão Molar (%)	Método	Concentração de Lipídios (mg/mL)	Concentração de BTCl ( $\mu\text{M}$ )	Tampão	Porcentagem de Encapsulação (%)
PC : CH	70 : 30	REV	10	200	PBS (1/10)	9,0 (18 $\mu\text{M}$ )
PC : CH : DOTAP	67 : 30 : 3	REV	10	200	PBS (1/10)	16,0 (32 $\mu\text{M}$ )
PC : CH : DOTAP	64 : 30 : 6	REV	10	200	PBS (1/10)	49,4 (98,8 $\mu\text{M}$ )
PC : CH	70 : 30	F/T	10	200	PBS (1/10)	13,8 (27,6 $\mu\text{M}$ )
PC : CH : DOTAP	64 : 30 : 6	F/T	10	200	PBS (1/10)	51,1 (102,2 $\mu\text{M}$ )
PC : CH	70 : 30	DRV	10	200	PBS (1/10)	20,2 (40,4 $\mu\text{M}$ )
PC : CH : DOTAP	64 : 30 : 6	DRV	10	200	PBS (1/10)	28,4 (56,8 $\mu\text{M}$ )

**PC:** fosfatidilcolina de ovo  
**CH:** colesterol  
**DOTAP:** fosfolípido carregado positivamente  
**REV:** Fase reversa  
**F / T:** Congelamento / Descongelamento  
**DRV:** Desidratação e Re-hidratação

**Tabela 15.** Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de formulações lipossomais de BTCl.

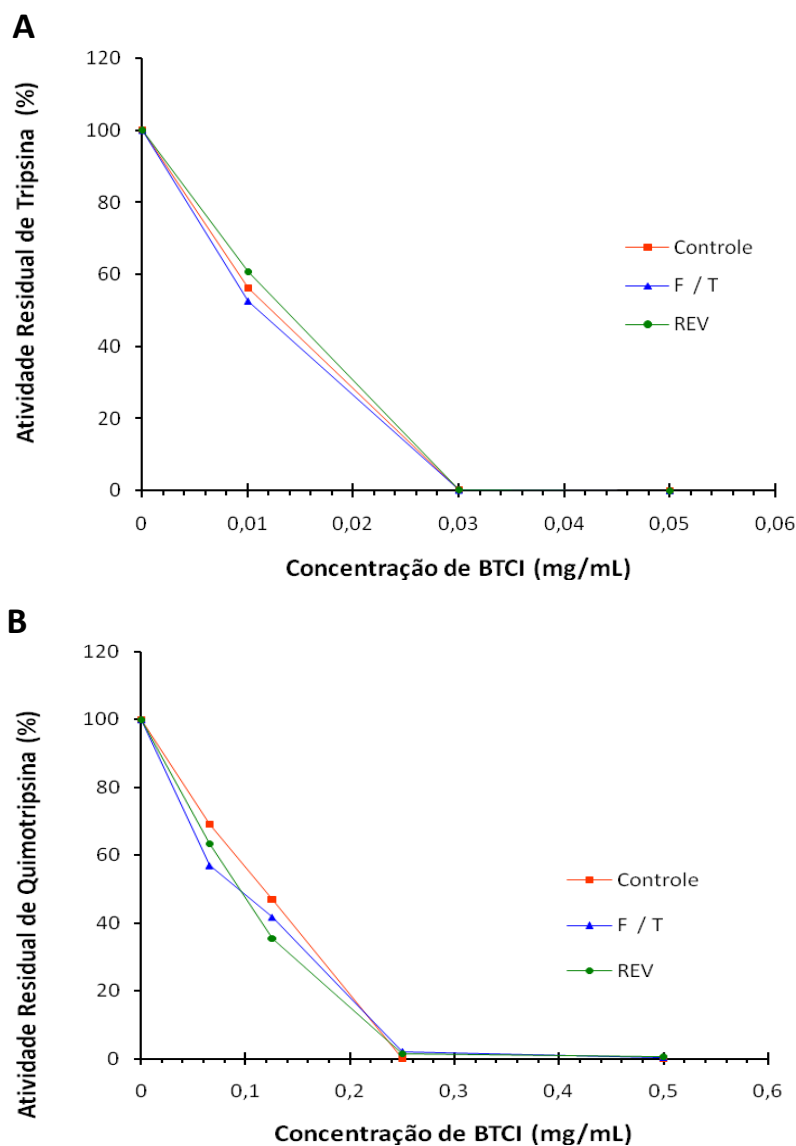
Composição	Razão Molar (%)	Método	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
PC : CH	70 : 30	REV	528	0,39	- 16,05
PC : CH : DOTAP	67 : 30 : 3	REV	312	0,372	+ 25,30
PC : CH : DOTAP	64 : 30 : 6	REV	257	0,37	+ 35,95
PC : CH	70 : 30	F/T	391	0,344	- 10,02
PC : CH : DOTAP	64 : 30 : 6	F/T	315	0,319	+ 32,46
PC : CH	70 : 30	DRV	248	0,105	- 12,30
PC : CH : DOTAP	64 : 30 : 6	DRV	230	0,125	+ 43,57

**PC:** fosfatidilcolina de ovo  
**CH:** colesterol  
**DOTAP:** fosfolípido carregado positivamente  
**REV:** Fase reversa  
**F / T:** Congelamento / Descongelamento  
**DRV:** Desidratação e Re-hidratação

A formulação PC:CH:DOTAP (64:30:6 % razão molar) preparada tanto pelo método REV quanto pelo método F/T apresentou a melhor porcentagem de encapsulação, diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta, quando comparada às outras formulações (Tabela 15). Os métodos REV e F/T apresentam etapas intermediárias que podem alterar a estrutura e, conseqüentemente, a atividade de



proteínas. A avaliação da atividade inibitória do BTCl após passar por todas as etapas de cada método mostrou que não houve alterações significativas na atividade inibitória contra tripsina ou quimotripsina (Figura 40).



**Figura 40.** Interferência do método de encapsulação na atividade inibitória de BTCl. Amostras de BTCl foram submetidas aos métodos REV e F/T e a atividade inibitória foi comparada com amostras controle. A) Inibição de tripsina. B) Inibição de quimotripsina.

Por questões práticas, optou-se pelo método REV para encapsulação de BTCl. Foram realizadas alterações nesse método com o objetivo de melhorar ainda mais a porcentagem de encapsulação. A utilização do sonicador de ponteira, tampão PBS diluído 10 vezes e éter isopropílico aumentou a porcentagem de encapsulação e o tamanho dos lipossomos, quando comparados com o uso do banho de sonicação, dietil éter ou solução de glicose 5% (Tabelas 16, 17 e 18).

**Tabela 16.** Efeitos do tipo de sonicação utilizado no método REV no tamanho e na porcentagem de encapsulação de BTCl em lipossomos.

<b>Tipo de Sonicador</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Porcentagem de Encapsulação (%)</b>
Sonicador de Ponteira	278,3	0,375	49,40
Banho de Ultra-som	1200	0,32	16,30

**Tabela 17.** Efeitos do tipo de solvente utilizado no método REV\* no tamanho e na porcentagem de encapsulação de BTCl em lipossomos.

<b>Solvente</b>	<b>Proporção (v / v)</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Porcentagem de Encapsulação (%)</b>
Clorofórmio : Éter isopropílico	4 : 3	278,3	0,375	49,4
Clorofórmio : Dietil éter	4 : 3	857,0	0,399	25,36

\* Sonicador de ponteira

**Tabela 18.** Efeitos do tipo de tampão utilizado no método REV\* na porcentagem de encapsulação de BTCl em lipossomos.

<b>Composição</b>	<b>Razão Molar (%)</b>	<b>Tampão</b>	<b>Porcentagem de Encapsulação (%)</b>
EPC : CH : DOTAP	64 : 30 : 6	PBS (1/10)	49,40
EPC : CH : DOTAP	64 : 30 : 6	5% glicose	23,65

\* Sonicador de ponteira e éter isopropílico.

A adição de fosfolípidios carregados positivamente (DOTAP) na composição lipossomal aumentou significativamente a porcentagem de encapsulação devido às interações iônicas entre proteína e lipídio. A análise das variações no tamanho das nanoestruturas, nas etapas do protocolo de encapsulação, sugere que o BTCl está

encapsulado e que esse processo passa por uma etapa de agregação antes da filtração, seguida de um restabelecimento do tamanho do lipossomo para um valor ligeiramente maior que o do lipossomo vazio após a filtração (Tabela 19). A análise do potencial zeta dos lipossomos nas etapas de encapsulação permitiu acompanhar as variações de carga das nanoestruturas na presença de BTCI. A diminuição do potencial zeta de +51,32 para + 35,95 mV após a encapsulação do BTCI sugere que há moléculas de BTCI expostas na superfície externa dos lipossomos (Tabela 19).

**Tabela 19.** Potencial zeta de lipossomos durante o processo de encapsulação de BTCI pelo método REV.

	<b>Diâmetro hidrodinâmico (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
LP-DOTAP vazio	133,0	0,150	+ 51,32
LP-DOTAP BTCI antes filtração	1739,6	0,258	- 5,20
LP-DOTAP BTCI depois filtração	278,3	0,375	+ 35,95

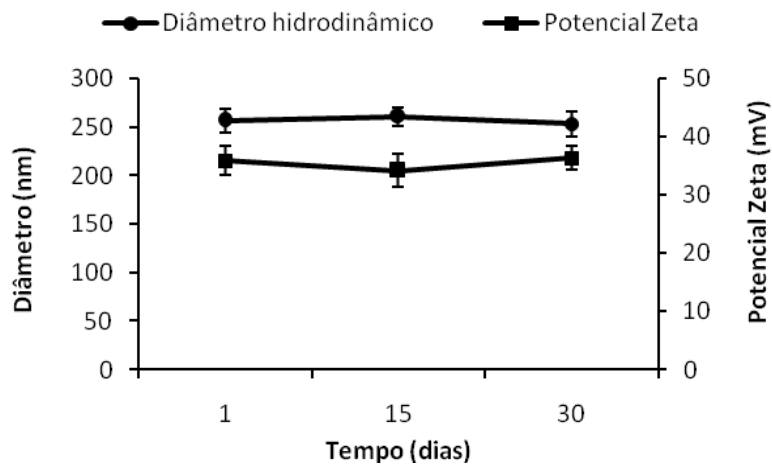
Esse dado foi confirmado ao avaliar a atividade inibitória de BTCI lipossomal, sem o rompimento dos lipossomos (sem adição de Triton X-100). Cerca de 14% do BTCI encapsulado encontra-se na superfície externa dos lipossomos (Tabela 20).

**Tabela 20.** Atividade inibitória e quantificação da concentração de BTCI presente nas superfícies interna e externa de lipossomos preparados pelo método REV.

	<b>Atividade Residual (%)</b>		<b>Concentração de BTCI (mg/mL)</b>		<b>% BTCI Total</b>	
	<b>Com Triton X-100</b>	<b>Sem Triton X-100</b>	<b>Com Triton X-100</b>	<b>Sem Triton X-100</b>	<b>Superfície interna</b>	<b>Superfície externa</b>
Tripsina	0	7,00 ± 0,35	0,36 ± 0,020	0,053 ± 0,012	85,3 ± 0,50	14,7 ± 0,33
Quimotripsina	4,73 ± 0,5	71,23 ± 0,64	0,36 ± 0,015	0,050 ± 0,024	87,0 ± 0,41	13,0 ± 0,66

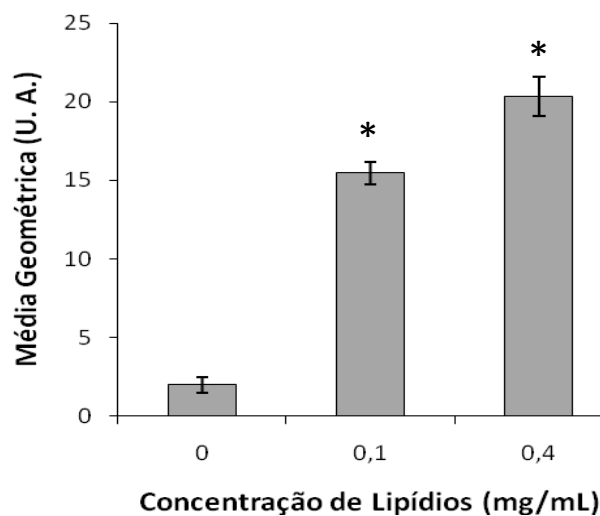
A estabilidade dos lipossomos preparados pelo método REV e armazenados a 4°C foi avaliada por 30 dias. Tanto o diâmetro hidrodinâmico quanto o potencial

zeta das nanoestruturas não alteraram durante esse período, sugerindo que a formulação permaneceu estável (Figura 41).



**Figura 41.** Estabilidade de BTCI lipossomal contendo DOTAP. A estabilidade foi avaliada com relação ao diâmetro hidrodinâmico e ao potencial zeta de lipossomos preparados pelo método REV e armazenados a 4°C.

A interação de BTCI lipossomal com células MCF-7 foi avaliada. Primeiramente, a interação dos lipossomos com relação à concentração de lipídios foi comparada e mostrou que a incubação de 0,4 mg/mL de lipídios por 6 horas resultou no aumento das interações do BTCI lipossomal com as células, quando comparada com a concentração de 0,1 mg/mL (Figura 42).

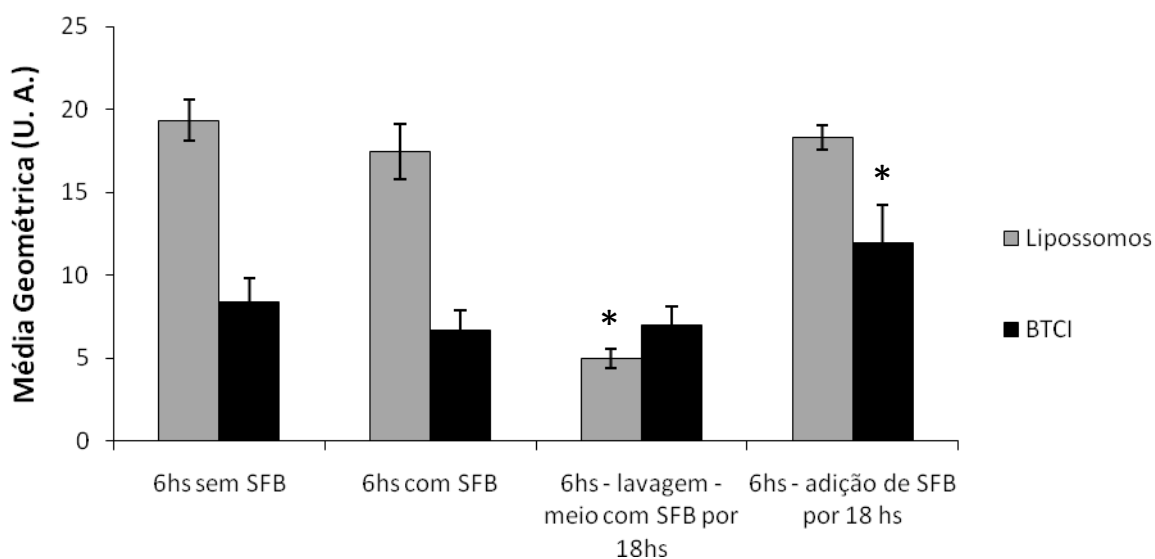


**Figura 42.** Interação de BTCL lipossomal com células de câncer de mama. Células MCF-7 foram incubadas por 6 horas com BTCL lipossomal (marcado com rodamina B). A interação dos lipossomos com as células foi analisada por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em média geométrica e representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado ao seu respectivo controle.

Em seguida, a interferência de soro fetal bovino, presente no meio de cultura, na interação de BTCL lipossomal com células MCF-7 foi comparada (Figura 43). Para isso duas amostras de BTCL lipossomal foram usadas: a) sonda fluorescente marcando os lipídios ou b) sonda fluorescente marcando o BTCL. A presença de soro fetal bovino no meio de cultura não interferiu na proporção de BTCL lipossomal associado com as células após 6 horas de incubação.

Para melhor entender a cinética de interação do BTCL lipossomal com células MCF-7, foram feitas análises nos tempos de 6 e 24 horas após a incubação. No tempo de 24 horas, BTCL lipossomal foi ou não removido após 6 horas de incubação e as células foram incubadas por mais 18 horas. As cinéticas de interação entre os tempos de 6 e 24 horas foram comparadas (Figura 43). Interessantemente, a remoção de BTCL lipossomal após as 6 horas de incubação e análise após mais 18

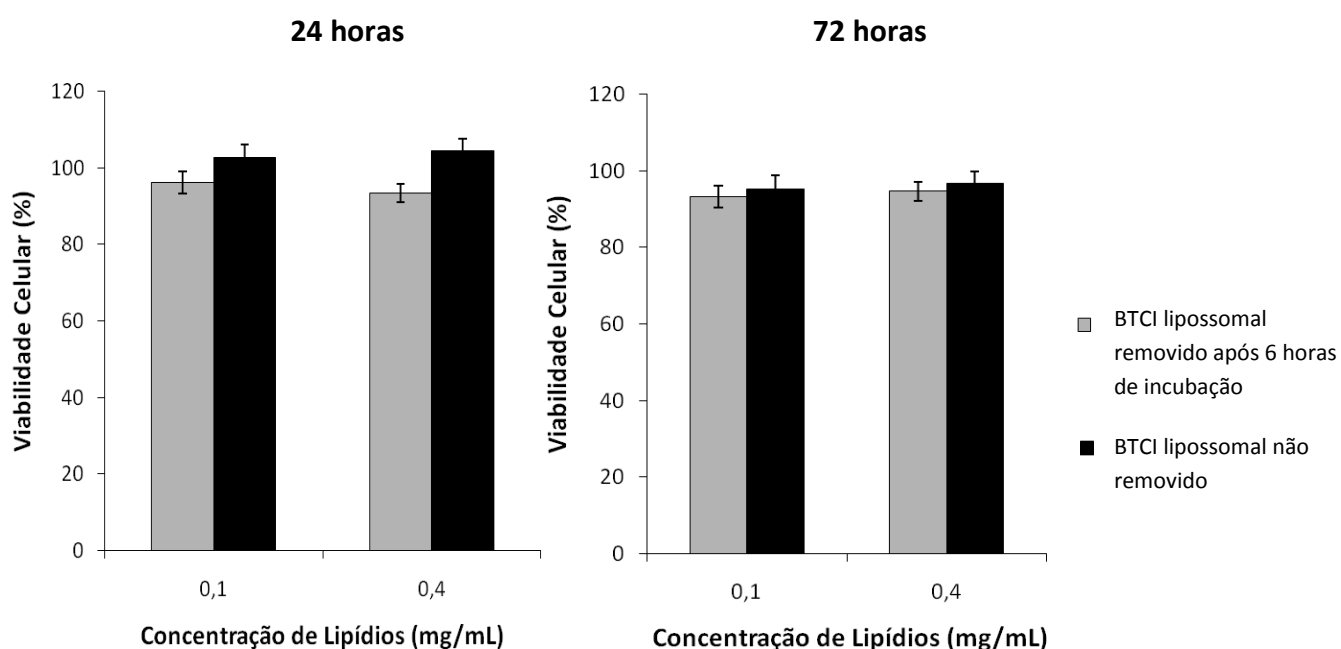
horas resultou na redução da proporção de lipossomos, mas não alterou significativamente a proporção de BTCl associado. Já a Incubação de BTCl lipossomal por 24 horas não alterou a proporção de lipossomos, mas aumentou a proporção de BTCl associado com as células, quando comparado com o tempo de 6 horas.



**Figura 43.** Interação de BTCl lipossomal com células de câncer de mama. Células MCF-7 foram incubadas por 6 horas com 0,4 mg/mL BTCl lipossomal. A interação dos lipossomos ou do BTCl (ambos marcados com sondas fluorescentes) com as células foi analisada por citometria de fluxo. SFB: soro fetal bovino. Os dados estão expressos em média geométrica e representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado com o grupo 6 horas sem SFB.

A citotoxicidade de BTCl lipossomal foi avaliada nos tempos de 24 e 72 horas, seguindo o protocolo de tratamento similar ao da figura 43. Apesar dos resultados anteriores mostrarem que BTCl lipossomal está associado com células MCF-7, não foi observado nenhum efeito significativo na redução da viabilidade celular das mesmas (Figura 44). Esses resultados sugerem que a concentração de

BTCl necessária para se obter o efeito citotóxico é maior do que a obtida com a incubação do BTCl lipossomal, nos tempos avaliados. Dessa forma, para intensificar o processo de interação dos lipossomos com as células, decidiu-se utilizar a estratégia de interação ativa. Nesse caso, um ligante com afinidade para receptores super-expressos em células tumorais é conjugado na superfície dos lipossomos com a finalidade de intensificar o processo de interação dos mesmos com as células. O ligante escolhido foi a transferrina, uma vez que células MCF-7 apresentam receptores de transferrina super-expressos (VYHLIDAL et al., 2002).



**Figura 44.** Efeito de BTCl lipossomal na viabilidade celular. Células de câncer de mama (MCF-7) foram incubadas com 0,1 ou 0,4 mg/mL de BTCl lipossomal por diferentes tempos: remoção de BTCl lipossomal após 6 horas e incubação com meio de cultura até completar o total de 24 ou 72 horas; ou incubação de BTCl lipossomal por um total de 24 e 72 horas, sendo que SFB foi adicionado ao meio de cultura após 6 horas de incubação. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado com 100% de viabilidade celular.

Primeiramente, os efeitos da adição de diferentes concentrações dos conjugados de transferrina-PEG<sub>2000</sub>-PE (Tf-PE) no tamanho e no potencial zeta de lipossomos vazios foram avaliados (Tabela 21).

**Tabela 21.** Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de lipossomos vazios incubados com conjugados de transferrina-PEG<sub>2000</sub>-PE.

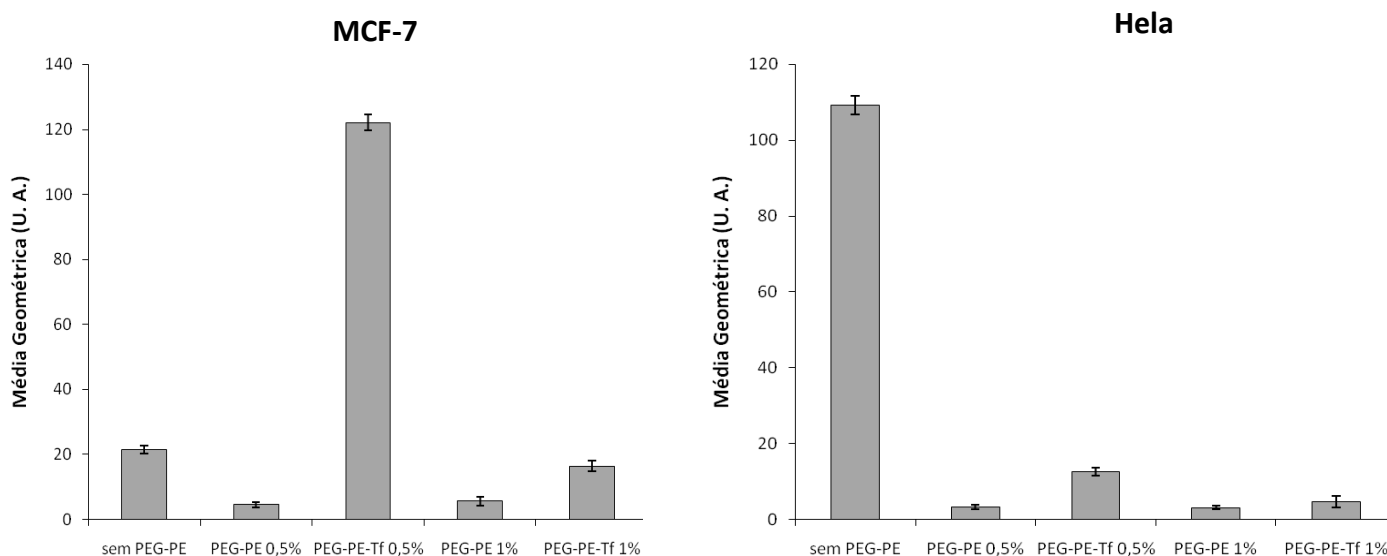
PEG <sub>2000</sub> -PE- Transferrina (%)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
0	203,0	0,325	+ 51,30
0,25	1174,0	0,267	+ 15,99
0,50	1143,0	0,316	- 6,03
1,00	168,9	0,302	- 20,10
2,00	148,7	0,295	- 25,70

À medida que maiores porcentagens de Tf-PE foram acrescentadas, o potencial zeta dos lipossomos foi se tornando mais negativo, indicando a interação dos conjugados em sua superfície. Agregados com diâmetro hidrodinâmico em torno de 1000 nm foram formados com a adição de quantidades iguais ou menores a 0,5% Tf-PE. Em contrapartida, a adição de concentrações maiores ou iguais a 1% Tf-PE resultou em lipossomos com diâmetro semelhante ao original (Tabela 21).

A interação dos lipossomos com ou sem Tf-PE com células MCF-7 e Hela foram comparadas (Figura 45). A linhagem Hela (câncer de colo de útero) também apresenta uma super-expressão de receptores de transferrina (DANIELS et al., 2006) e por isso foi incluída nessas investigações. A interação de lipossomos com PEG<sub>2000</sub>-PE não conjugado à transferrina foram utilizadas para comparação. Na linhagem MCF-7, a interação de lipossomos sem ou com 1% Tf-PE foram semelhantes. No entanto, notou-se um aumento expressivo na interação de lipossomos com 0,5% Tf-PE. O oposto ocorreu na linhagem Hela onde um aumento expressivo na interação de lipossomos sem Tf-PE foi observado. As formulações



sem PEG<sub>2000</sub>-PE e com 0,5% Tf-PE foram utilizadas nos estudos seguintes devido à maior proporção de interação celular observada com Hela e MCF-7 respectivamente.

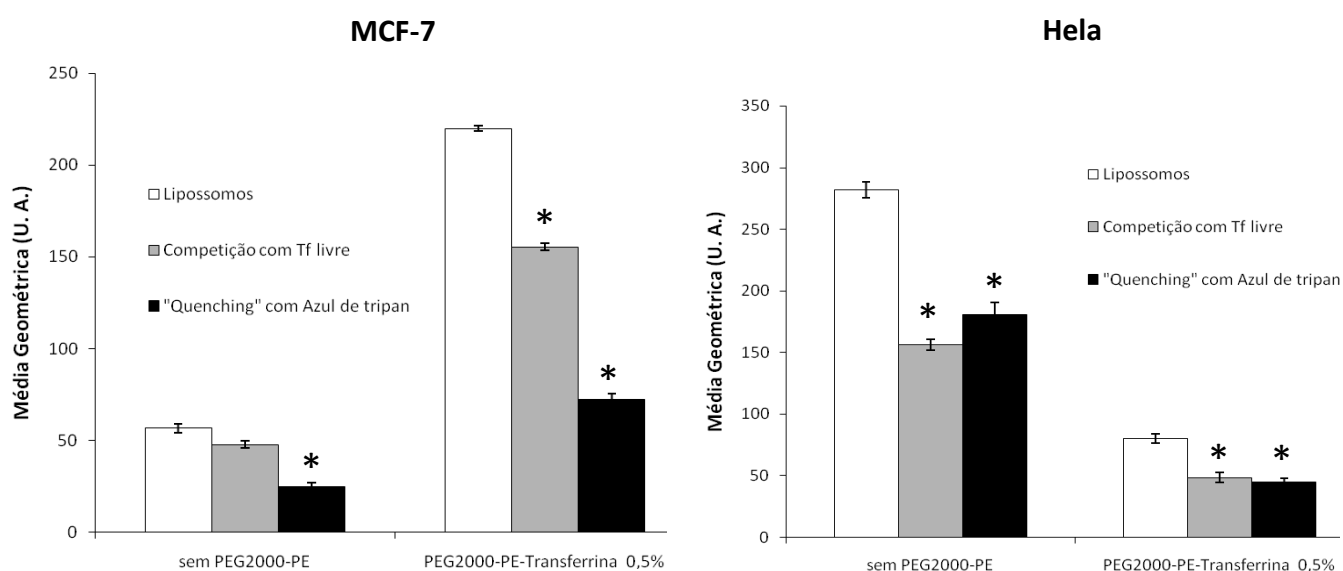


	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
sem PEG <sub>2000</sub> -PE	203	0,307	+ 51,30
PEG <sub>2000</sub> -PE 0,5%	213,2	0,254	+ 19,01
PEG <sub>2000</sub> -PE-Transferrina 0,5%	1007,1	0,381	+ 2,15
PEG <sub>2000</sub> -PE 1%	168,9	0,204	- 6,56
PEG <sub>2000</sub> -PE-Transferrina 1%	148,7	0,319	- 22,73

**Figura 45.** Interação de lipossomos, com ou sem transferrina, às células tumorais. Células MCF-7 (câncer de mama) e Hela (câncer de colo do útero) foram incubadas por 6 horas com 0,4 mg/mL de lipossomos com ou sem transferrina conjugada em sua superfície em meio de cultura sem soro. A interação dos lipossomos (marcados com sonda fluorescente) com as células foi analisada por citometria de fluxo. A tabela abaixo dos gráficos contém características de cada formulação testada. Os dados estão expressos em média geométrica e representados como média ± erro padrão.

Para investigar a importância da transferrina na interação dos lipossomos às células, um ensaio de competição com transferrina livre foi realizado (Figura 46). Nesse ensaio, moléculas de transferrina livre são incubadas previamente com as

células. Elas se ligam aos receptores primeiro e reduzem a disponibilidade de receptores para a interação dos lipossomos com Tf-PE em sua superfície. Os resultados mostraram que na linhagem MCF-7, a adição de transferrina livre reduziu a interação de lipossomos 0,5% Tf-PE, mas não influenciou significativamente na interação de lipossomos sem PEG<sub>2000</sub>-PE. Na linhagem Hela houve uma redução na interação tanto de lipossomos sem PEG<sub>2000</sub>-PE como dos com 0,5 % Tf-PE (Figura 46).

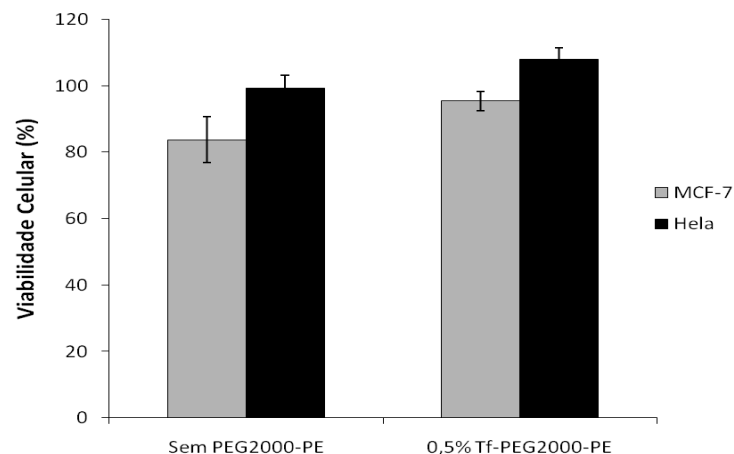


**Figura 46.** Proporção de lipossomos internalizados e a influência da adição de transferrina livre na interação de lipossomos, com ou sem transferrina, com células tumorais. Células MCF-7 (câncer de mama) e Hela (câncer de colo do útero) foram incubadas por 6 horas com 0,4 mg/mL de lipossomos com ou sem transferrina conjugada em sua superfície em meio de cultura sem soro. A interação dos lipossomos (marcados com sonda fluorescente) às células foi analisada por citometria de fluxo. A influência da transferrina para a interação dos lipossomos foi avaliada em ensaio de competição com transferrina livre. A proporção de lipossomos internalizados foi avaliada após a adição de azul tripan que bloqueia a fluorescência dos lipossomos ligados à superfície celular externa. Os dados estão expressos em média geométrica e representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado com lipossomos sem a adição de transferrina ou azul tripan.

As análises de interações de lipossomos por citometria de fluxo não permitem especificar se os lipossomos estão apenas associados à membrana plasmática ou

estão de fato internalizados. A proporção de lipossomos associados à superfície externa das células foi avaliada acrescentando o corante azul tripan nas amostras. Como esse corante não atravessa a membrana plasmática das células, sua ação na atenuação da fluorescência de lipossomos (*quenching*) ocorre apenas nas nanoestruturas ligadas na superfície externa das células (LOIKE et al., 1983). Na linhagem MCF-7, a adição de azul tripan reduziu a fluorescência de lipossomos sem PEG<sub>2000</sub>-PE e de lipossomos com 0,5% Tf-PE, indicando que havia em torno de 50% e 67%, respectivamente, de lipossomos associados na superfície das células (Figura 46). Na linhagem Hela, a redução na fluorescência dos lipossomos foi de 35,6% para lipossomos sem PEG<sub>2000</sub>-PE e de 44,3% para lipossomos com 0,5% Tf-PE, indicando que mais de 50% dos lipossomos, para ambas as formulações, estavam internalizados (Figura 46).

Em seguida, a citotoxicidade de BTCI lipossomal com ou sem 0,5% Tf-PE foi investigada nas linhagens MCF-7 e Hela, por 72 horas (Figura 47). Não houve diferença significativa na viabilidade das células após o tratamento.

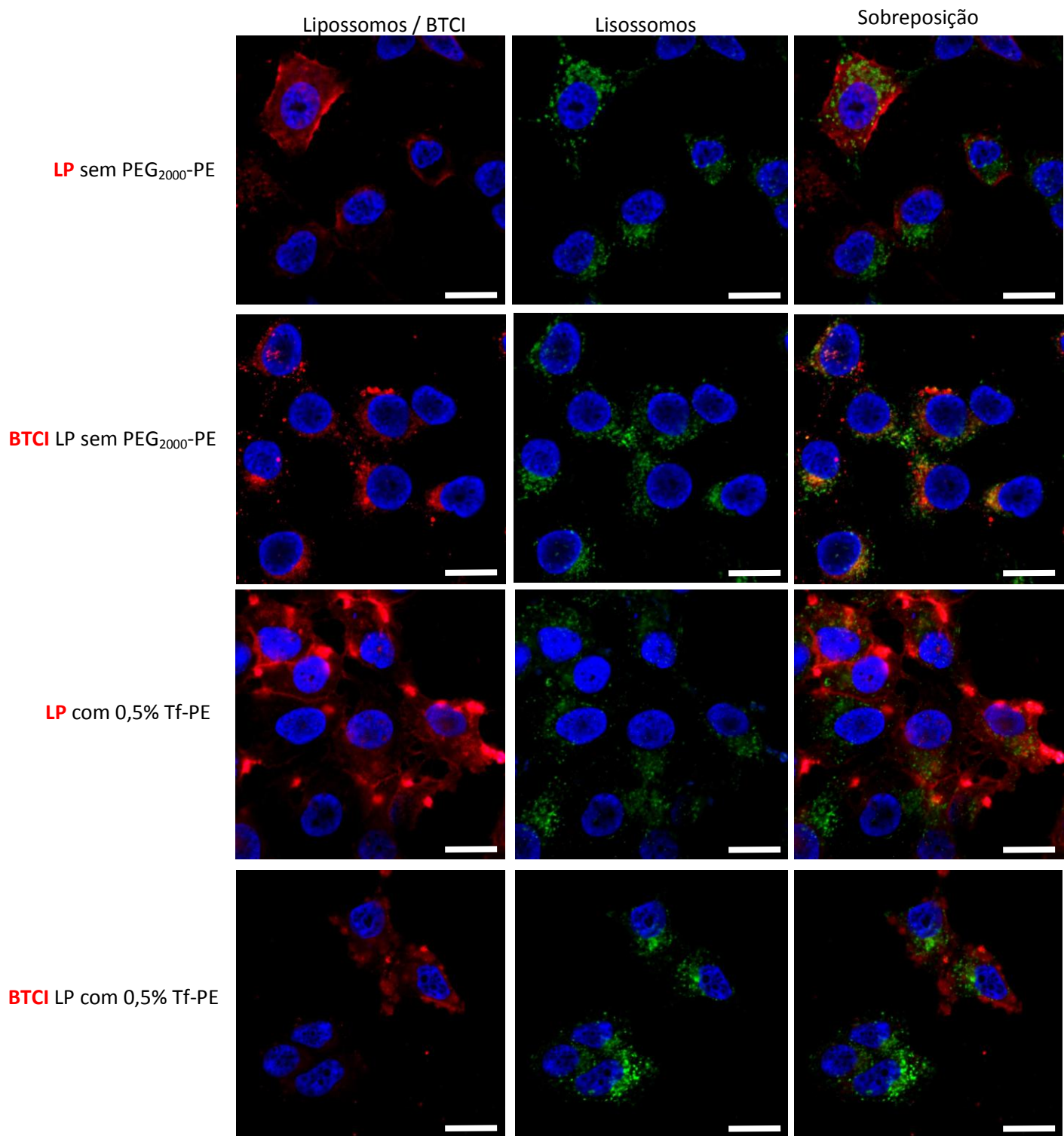


**Figura 47.** Efeito de BTCI lipossomal, com ou sem transferrina, na viabilidade celular. Células MCF-7 (câncer de mama) e HeLa (câncer de colo do útero) foram incubadas por 72 horas com 0,4 mg/mL de lipossomos sem ou com 0,5 % transferrina conjugada em sua superfície em meio de cultura sem soro. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado com 100% de viabilidade celular.

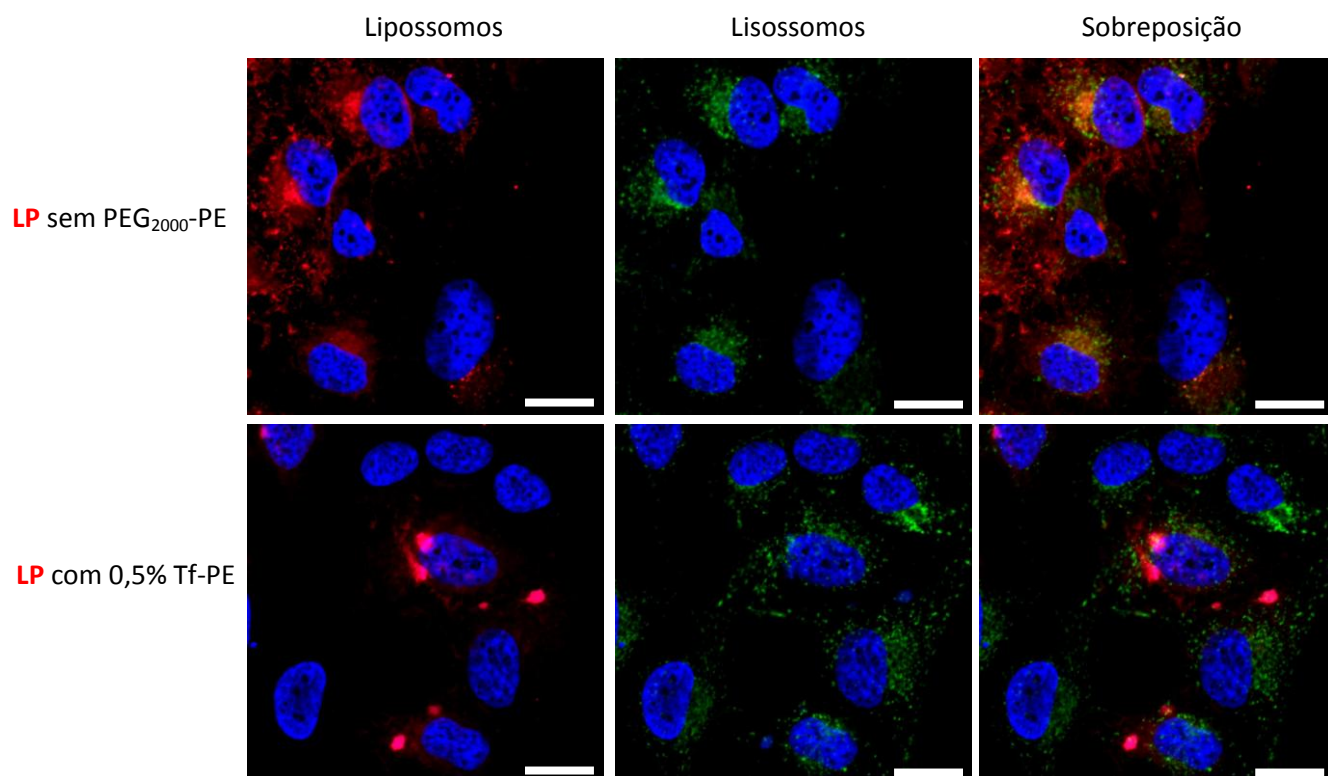
A co-localização de BTCI lipossomal com lisossomos foi investigada por microscopia confocal para determinar o destino celular final dessas nanoestruturas, após a internalização por células tumorais (Figuras 48 e 49).

Na linhagem MCF-7, observou-se que lipossomos sem PEG<sub>2000</sub>-PE foram internalizados e apresentam-se difusos pelo citoplasma. Já lipossomos com 0,5% Tf-PE não foram internalizados completamente, uma vez que agregados de lipossomos ficaram aderidos à superfície externa das células. Não foi observada co-localização expressiva de ambas as formulações com lisossomos (Figura 48 e Tabela 22). Moléculas de BTCI entregue por lipossomos sem PEG<sub>2000</sub>-PE estavam concentradas ao redor do núcleo das células e co-localizados com lisossomos em algumas áreas (Figura 48 e Tabela 22). As moléculas de BTCI entregues por lipossomos 0,5% Tf-PE apresentaram-se de forma difusa no citoplasma de apenas algumas células, com

baixo índice de co-localização com lisossomos (Figura 48 e Tabela 22). Na linhagem HeLa, lipossomos sem PEG<sub>2000</sub>-PE foram internalizados e co-localizados com lisossomos. Entretanto, lipossomos com 0,5% Tf-PE não foram internalizados e encontravam-se aderidos à superfície de apenas algumas células (Figura 49 e Tabela 22).



**Figura 48.** Co-localização de BTCI lipossomal e lisossomos de células de câncer de mama. Células MCF-7 foram incubadas por 9 horas com 0,4 mg/mL BTCI lipossomal sem ou com 0,5% transferrina conjugada. As análises foram feitas separadamente com o BTCI ou lipossomos (LP) marcados com sonda fluorescente (destaque em vermelho na legenda à esquerda das imagens). Imagens obtidas por microscopia confocal. Nas imagens destacam-se lipossomos/BTCI (vermelho); lisossomos (proteína LAMP-2, em verde) e o núcleo (azul). Barra: 20 µm.



**Figura 49.** Co-localização de BTCl lipossomal e lisossomos de células de câncer de colo do útero. Células HeLa foram incubadas por 9 horas com 0,4 mg/mL BTCl lipossomal sem ou com 0,5% transferrina conjugada. As análises foram feitas com lipossomos (LP) marcados com sonda fluorescente (destaque em vermelho na legenda à esquerda das imagens). Imagens obtidas por microscopia confocal. Nas imagens destacam-se lipossomos (vermelho); lisossomos (proteína LAMP-2, em verde) e o núcleo (azul). Barra: 20  $\mu$ m.

**Tabela 22.** Coeficientes para determinação de co-localização entre lipossomos/BTCl e lisossomos de células tumorais.

Linhagem	Molécula marcada	Coeficiente de Pearson <sup>a</sup>		Coeficiente de Mander <sup>b</sup>	
		LP sem PEG <sub>2000</sub> -PE	LP-Tf 0,5%	LP sem PEG <sub>2000</sub> -PE	LP-Tf 0,5%
MCF-7	Lipossomos	0,095 $\pm$ 0,064	0,168 $\pm$ 0,060	0,397 $\pm$ 0,044	0,446 $\pm$ 0,087
MCF-7	BTCl	0,423 $\pm$ 0,115	0,201 $\pm$ 0,099	0,576 $\pm$ 0,092	0,408 $\pm$ 0,076
HeLa	Lipossomos	0,479 $\pm$ 0,043	0,084 $\pm$ 0,079	0,605 $\pm$ 0,029	0,298 $\pm$ 0,073

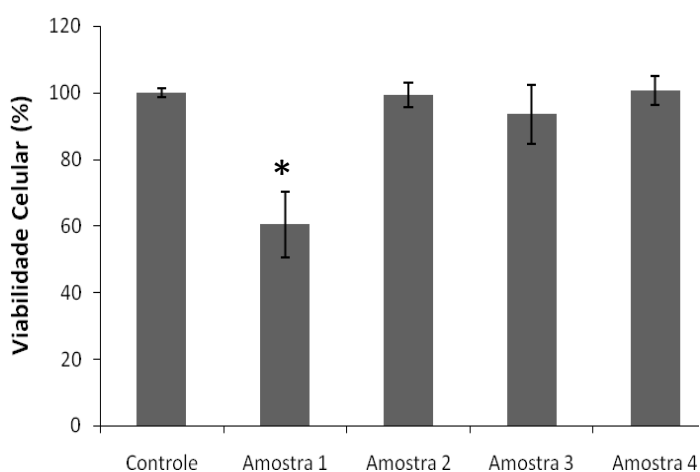
**a:** Correlação da distribuição de intensidades entre dois canais fluorescentes. Varia de -1 a +1.

**b:** Calcula a sobreposição de dois canais fluorescentes normalizando diferenças de intensidade entre eles. Varia de 0 a 1.

## 5.4 Identificação de compostos bioativos em amostras de BTCl

A agregação e redução na biodisponibilidade de BTCl em meio de cultura foi superada pela entrega direta dessa molécula no citoplasma das células por meio de lipossomos. No entanto, essa estratégia de entrega não resultou em citotoxicidade em células tumorais. Para compreender as razões pelas quais o tratamento de células MCF-7 com BTCl resulta ora na redução, manutenção ou aumento da viabilidade celular, a hipótese da presença de outra molécula em algumas frações de BTCl purificado, que possa induzir citotoxicidade, isoladamente ou em sinergismo, com o BTCl foi testada.

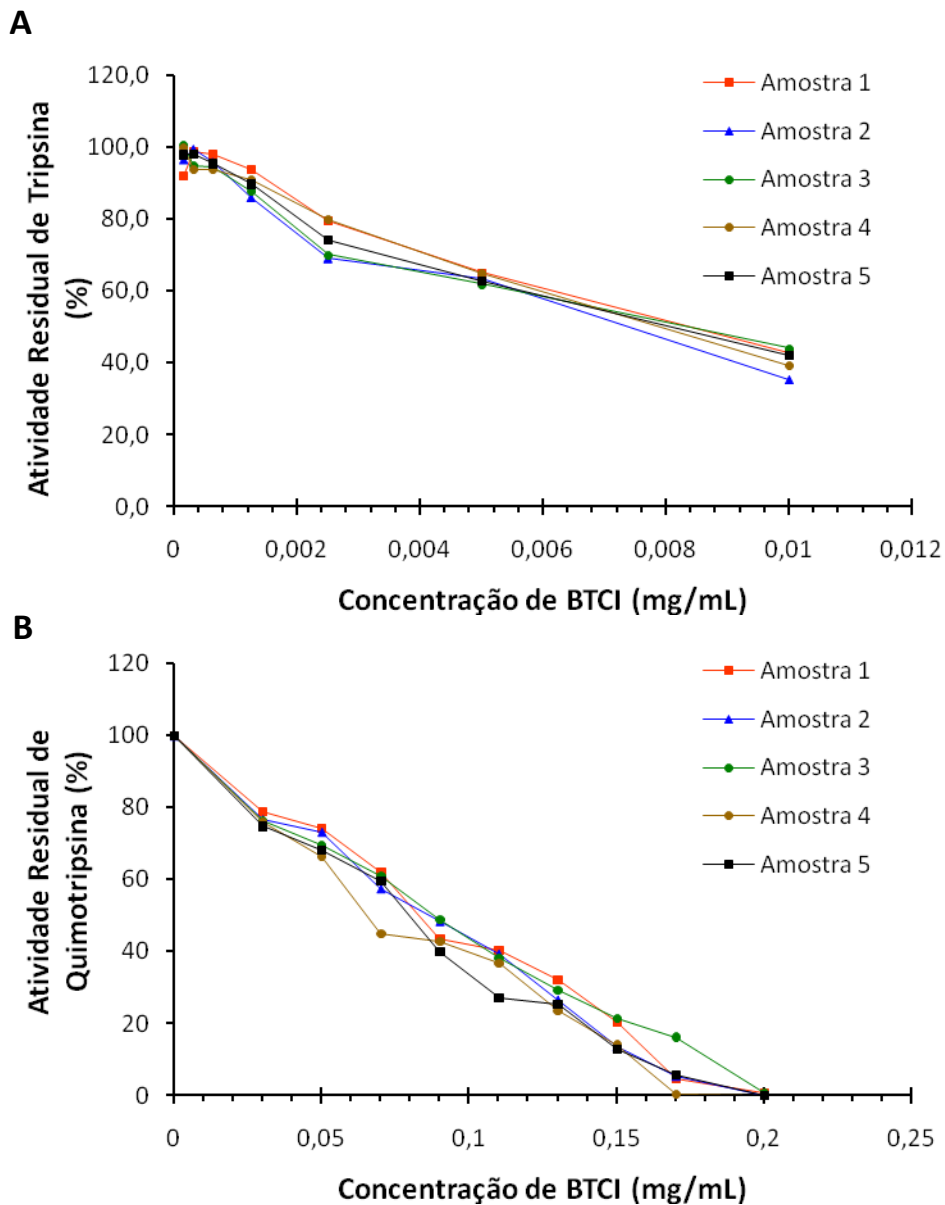
Primeiramente, foram selecionadas amostras de BTCl puro que, apesar de apresentarem perfil de pureza semelhante ao mostrado pela técnica de MALDI-TOF (Figura 15), induziram efeitos distintos na viabilidade celular de células MCF-7 (Figura 50). Em seguida, as amostras foram comparadas entre si por diferentes técnicas para detectar a presença de outras moléculas, tanto de natureza protéica quanto lipídica.



**Figura 50.** Efeito de diferentes amostras de BTCl na viabilidade de células de câncer de mama. Células MCF-7 foram incubadas por 72 horas com diferentes amostras de BTCl (200  $\mu$ M) purificado de sementes de *V. unguiculata*. A viabilidade celular foi determinada por MTT. Os dados estão expressos em porcentagem e representados como média  $\pm$  erro padrão. Teste de Scheffé, \*  $p < 0,001$  comparado com o grupo controle.

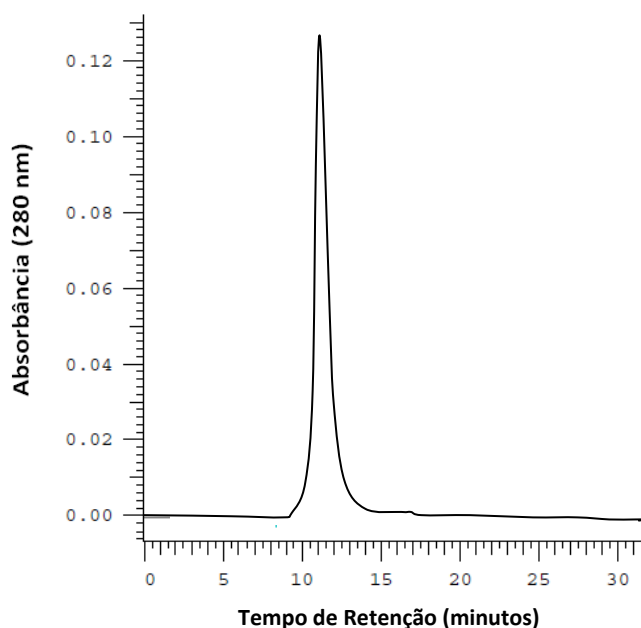


As amostras de BTCI foram comparadas quanto a atividade de inibição das proteases tripsina e quimotripsina (Figura 51). Diferenças pontuais na atividade de inibição de proteases foram observadas, mas, de forma geral, a atividade foi similar em todas as amostras.

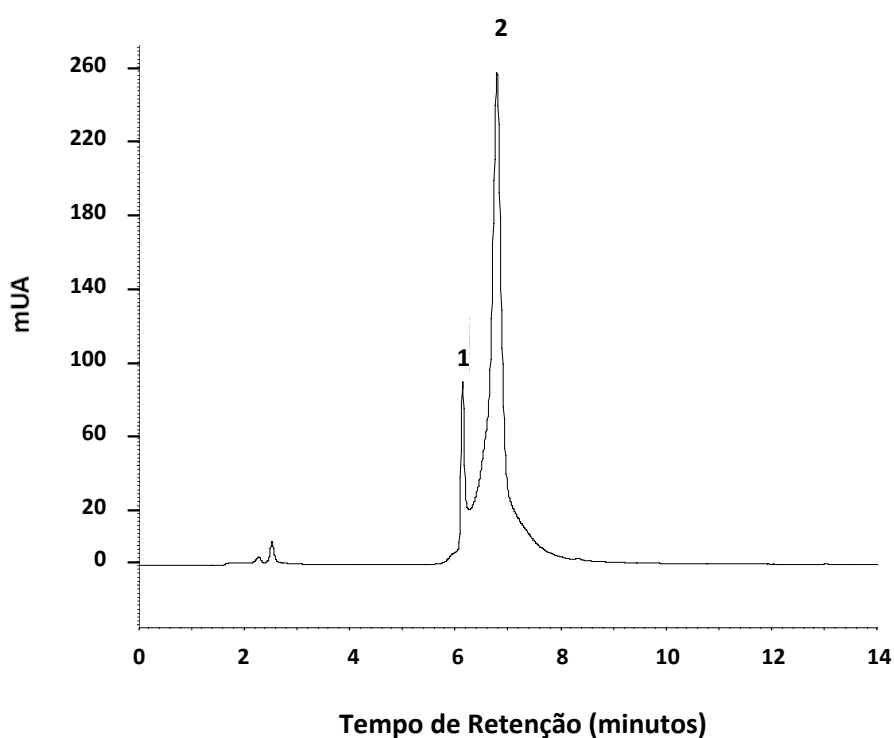


**Figura 51.** Atividade Inibitória de diferentes amostras de BTCI. A atividade inibitória de amostras de BTCI contra tripsina (A) ou quimotripsina (B) foram comparadas.

As amostras foram fracionadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em colunas específicas para exclusão molecular ou para fase reversa. Na cromatografia de exclusão molecular (Figura 52), todas as amostras apresentaram apenas um pico cuja massa molecular foi calculada como aproximadamente 9 kDa, ou seja, a mesma massa molecular do BTCl puro identificada por MALDI-TOF (Figura 15). Na cromatografia de fase reversa, dois picos com intensidades diferentes foram observados, correspondendo a aproximadamente 11 e 89% da quantidade de BTCl utilizada nessa cromatografia (Figura 53 e Tabela 23). Entretanto, ambos os picos foram observados em proporções semelhantes em todas as amostras fracionadas.



**Figura 52.** Cromatograma de BTCl fracionado por HPLC em coluna de exclusão molecular. A fase móvel utilizada foi PBS (pH 7,4) com fluxo de 0,25 mL/minuto em coluna Shodex KW804.



**Figura 53.** Cromatograma de BTCl fracionado por HPLC de fase reversa em coluna C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm). Gradientes de acetonitrila na proporção de 0 - 32% por 5 minutos e 32 - 37% por 20 minutos foram utilizados. Fluxo de 1 mL/ min. O monitoramento da eluição foi realizado no comprimento de onda de 216 nm. Notar presença de dois picos (1 e 2) entre os tempos de retenção de 5,70 - 8,50 min.

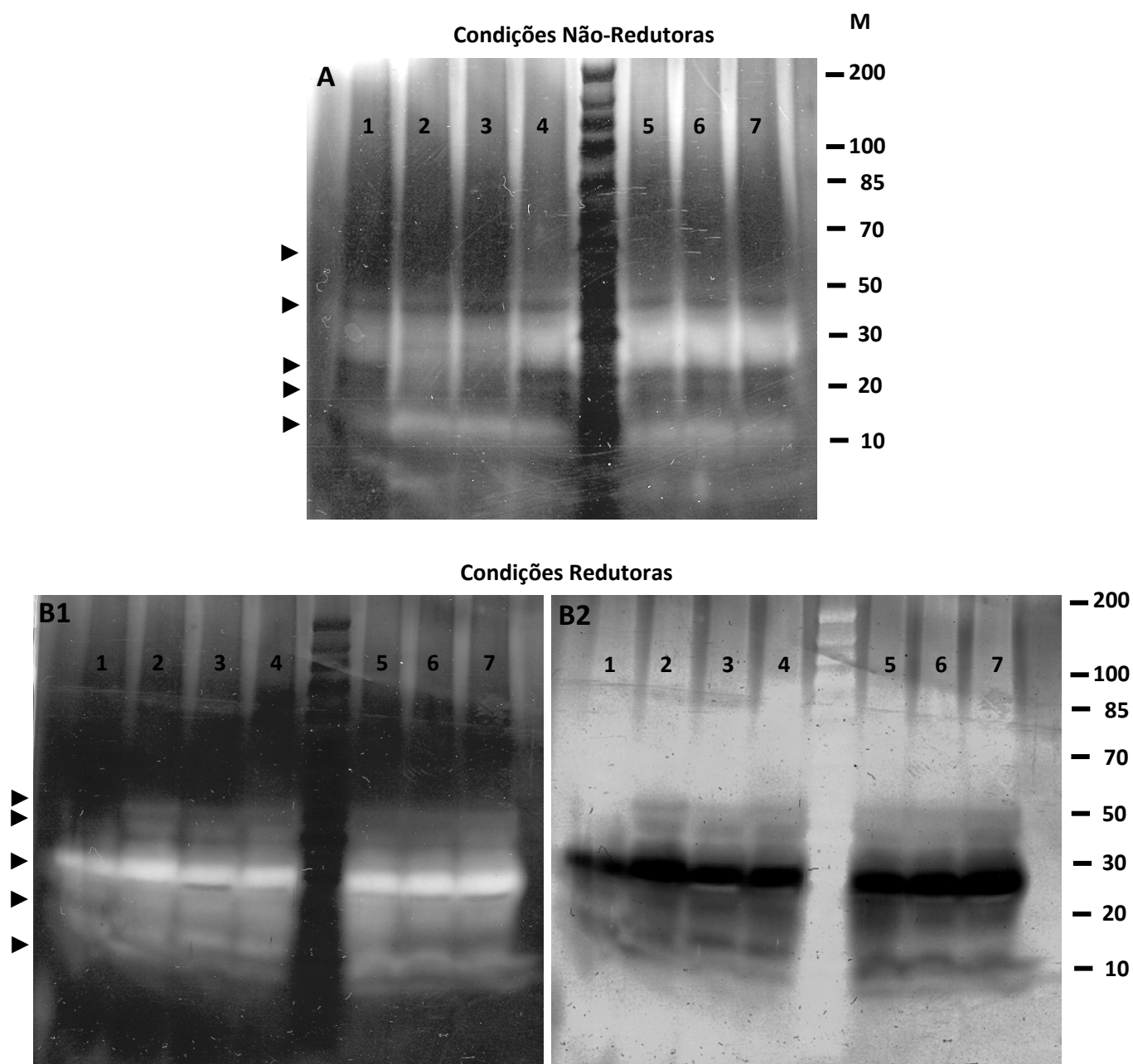
**Tabela 23.** Área integrada de picos de amostra de BTCl fracionada por HPLC de fase reversa (figura 53).

	Área integrada (mUA)		% da Amostra		[mg/mL]	
	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2
<b>BTCl</b>	2256575	17291512	11,55	88,45	0,23	1,77

As amostras de BTCl foram então analisadas por gel de poliacrilamida. É importante salientar que como o gel foi corado pelo método de precipitação de prata, as bandas podem mostrar uma coloração escura, caso estejam em baixa concentração, ou ausência de coloração, quando a concentração de proteínas é

muito alta (BIORAD, 2011). Em condições redutoras (adição do agente desnaturante DTT), observou-se uma banda predominante e também outras quatro bandas de menor concentração (Figura 54 B1). Para facilitar a visualização, as cores do gel foram digitalmente invertidas (Figura 54 B2). A banda predominante correspondeu à proteína de massa molecular entre 20 a 30 kDa, diferente do valor determinado por MALDI-TOF para o BTCl puro (9 kDa). O padrão de bandas foi similar entre as amostras de BTCl.

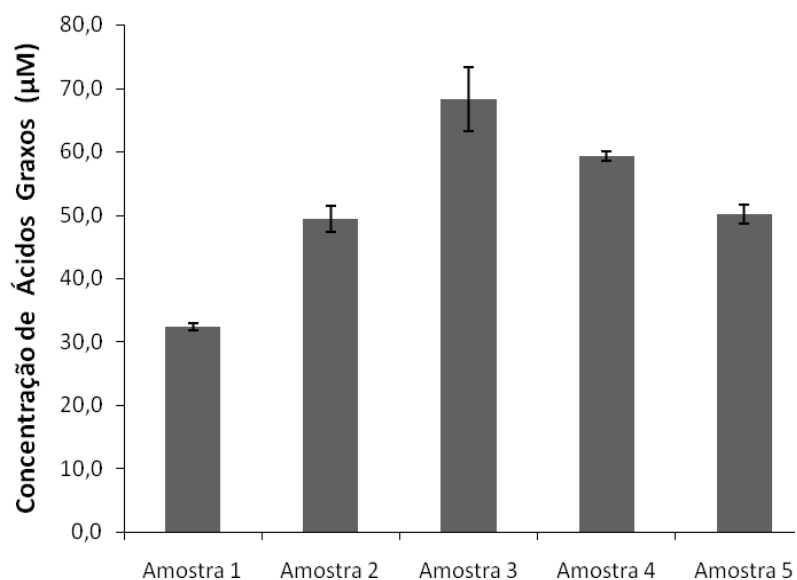
Em condições não-redutoras (ausência de DTT), o BTCl pode formar oligômeros que são detectados no gel por mais de uma banda formada (Figura 54 A). O padrão de bandas foi similar entre as amostras de BTCl. As amostras 2 e 3 apresentaram pequena diferença na intensidade de duas bandas, mas essa diferença não estava correlacionada com diferenças na citotoxicidade, uma vez que essas amostras apresentaram o mesmo padrão de citotoxicidade (Figura 50). Não foi possível inferir a massa molecular das amostras de proteínas observadas nas diferentes bandas no gel em condições não-desnaturantes, pois o marcador de proteínas utilizado é específico para géis em condições desnaturantes.



**Figura 54.** Amostras de BTCI analisadas por gel de poliacrilamida 16%. A eletroforese de amostras de BTCI (1 a 7) foram realizadas em: A) condições não-redutoras (ausência do agente desnaturante DTT); ou B) condições redutoras (presença de 0,1 mM de DTT). B1: imagem original; B2: inversão das cores da imagem para melhor visualização das bandas; M: marcador; ►: indicação das bandas.

Considerando os resultados obtidos, a presença de moléculas de natureza não protéica foi então investigada. As amostras de BTCI foram dosadas e comparadas com relação à concentração de ácidos graxos (Figura 55). Diferentes

concentrações de ácidos graxos foram detectadas em cada amostra, sendo que apenas a amostra contendo a menor concentração (30  $\mu\text{M}$ ) apresentou atividade citotóxica (Figura 50).



**Figura 55.** Concentração de ácidos graxos em amostras de BTCI. A concentração de ácidos graxos foi comparada em diferentes amostras de BTCI (200  $\mu\text{M}$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, os efeitos anticarcinogênicos do BTCI, na forma livre ou encapsulado em lipossomos, foram investigados. O modelo de indução tumoral escolhido para estudar os efeitos preventivos do BTCI e do extrato (EB) protéico de sementes de *V. unguiculata* foi o de indução química por DMBA/TPA na pele de camundongos. Esse modelo permite estudar em laboratório as influências que tratamentos e fatores locais, sistêmicos e ambientais exercem na susceptibilidade, crescimento e progressão do tumor. Ele já vem sendo empregado por várias décadas e até hoje continua a auxiliar na identificação de importantes vias moleculares e imunológicas envolvidas no câncer de pele não-melanoma.

O modelo consiste de dois estágios: o de iniciação e o de promoção. O estágio de iniciação é induzido com uma única aplicação tópica do reagente mutagênico DMBA, que é responsável por induzir uma mutação irreversível e específica no códon 61 do oncogene *Ha-ras* (FUJIKI et al., 1989; FILLER et al., 2007). O estágio de promoção é atingido com aplicações freqüentes do agente pró-inflamatório TPA. Após algumas semanas surgem lesões pré-malignas benignas conhecidas como papilomas (a partir de 10 a 12 semanas), as quais podem regredir ou progredir para o câncer de pele não-melanoma (a partir de 25 a 30 semanas). Com esse modelo, portanto, é possível monitorar eventos iniciais e tardios durante o desenvolvimento e progressão do câncer na pele. Além disso, esse modelo tem mostrado características fenotípicas similares às do desenvolvimento de câncer de pele não-melanoma em humanos, consistindo, portanto, de uma plataforma adequada para o estudo e desenvolvimento de novas drogas contra esse tipo de câncer (DLUGOSZ et al., 2002; FILLER et al., 2007). No presente trabalho, o modelo

de indução química de câncer de pele não-melanoma, até o estágio de aparecimento de lesões pré-malignas, foi estabelecido com sucesso e permitiu a observação dos efeitos preventivos do BTCl e do EB. Esses efeitos foram evidenciados macroscopicamente com relação a incidência, volume e aparência das lesões; e microscopicamente com relação às alterações histopatológicas examinadas (Figuras 18 a 25 e Tabela 4).

Sementes de leguminosas são fontes ricas de moléculas anticarcinogênicas como isoflavonas, inibidores de protease, lectinas, peptídeos, saponinas, inosítois e ácido fítico (DURANTI et al., 1997; JOANITTI et al., 2011). Essas moléculas apresentam diferentes mecanismos de ação e diferentes alvos moleculares e a combinação entre elas pode resultar em efeitos sinérgicos e aumentar a eficácia de um tratamento (DURANTI et al., 1997; YAN et al., 2002; LANE et al., 2006). Em particular, a semente de feijão-de corda (*V. unguiculata*) contém um total de 29% de proteínas (dentre elas inibidores de protease), ácidos graxos saturados (29,4%), monoinsaturados (8,8%) e poliinsaturados (61,9%), além de maior concentração de compostos fenólicos livres e taninos, em comparação com outros legumes (THANGADURAI, 2005; FROTA et al., 2008). O EB produzido no presente trabalho, a partir dessas sementes, contém aproximadamente 10 tipos de moléculas de natureza protéica (Figuras 16 e 17). A identificação de cada molécula ainda está em andamento, mas sabe-se que em torno de 8,5% das proteínas presentes foram identificadas como sendo o BTCl.

Nos experimentos de prevenção de câncer de pele não-melanoma, observou-se que o grupo tratado topicamente com solução aquosa de EB foi o que apresentou o melhor retardo na progressão tumoral. Apesar de ainda não terem sido



identificados todos os seus componentes, é possível sugerir que há um efeito sinérgico entre as moléculas do EB na prevenção desse tipo de câncer. Adicionalmente, os dados obtidos com o tratamento tópico utilizando o BTCI isoladamente sugerem que esse inibidor é uma das principais moléculas contidas no EB envolvidas nesse efeito.

No modelo de indução de câncer de pele não-melanoma por DMBA/TPA, muitas alterações em mecanismos moleculares e em vias de sinalização celular são bem estabelecidas e a avaliação das mesmas pode auxiliar na análise dos resultados de um tratamento preventivo. Além da atuação do DMBA como agente mutagênico, o papel do TPA como agente promotor é fundamental para o estabelecimento e progressão do tumor. Em geral, os efeitos do TPA são reversíveis, mas uma exposição prolongada induz a eventos genéticos irreversíveis em fases tardias da progressão tumoral (DLUGOSZ et al., 2002). Sucessivas aplicações de TPA resultam em uma inflamação crônica ativando vias de sinalização celular que regulam moléculas pró-inflamatórias, responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para a derme. Essas células secretam citocinas e fatores de crescimento que estimulam a proliferação das células da epiderme, remodelação tecidual, angiogênese e a produção de radicais livres, influenciando nas vias de sinalização e contribuindo para a instabilidade genética (DLUGOSZ et al., 2002).

Estímulos mitogênicos e inflamatórios induzidos pelo TPA estão relacionados com o aumento da expressão da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) que, em geral, apresenta-se em baixas concentrações em um tecido saudável. A super-expressão de COX-2 é crucial para o desenvolvimento das lesões tumorais, uma vez que a inibição dessa enzima, com o uso de drogas anti-inflamatórias, bloqueiam a

progressão tumoral. A COX-2 gera como sub-produtos diferentes prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, a partir da catálise da molécula de ácido araquidônico (DLUGOSZ et al., 2002). Seu sub-produto predominante nesse modelo de indução química é a prostaglandina E2 (PGE2), a qual atua em múltiplas vias de sinalização celular mediando efeitos na proliferação de células da epiderme, inflamação e angiogênese (DLUGOSZ et al., 2002).

No presente estudo, as análises de imunohistoquímica mostraram que a concentração e distribuição de COX-2 estavam reduzidas nos grupos tratados com BTCl ou EB (Figura 24). Nesses mesmos grupos, principalmente no do EB, as alterações histopatológicas decorrentes da ativação de COX-2 (proliferação celular, remodelação tecidual e angiogênese) também foram atenuadas (Tabela 4). Inibidores da família Bowman-Birk já foram descritos por apresentar atividades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (WARE et al., 1999; TOUIL et al., 2008; DAI et al., 2011; LI et al., 2011). Inflamações associadas à indução tumoral por agentes químicos foram inibidas pelo inibidor Bowman-Birk encontrado em sementes de soja (BBI) e também por BBIC, um extrato de sementes de soja rico em BBI (KENNEDY, 1998 a; KENNEDY, 1998 b). O BBI inibe proteases secretadas por células inflamatórias e reduz a produção de ânions superóxido por leucócitos, atenuando danos oxidativos que ocorrem na inflamação (LOSSO, 2008; LI et al., 2011). Outros trabalhos avaliaram os efeitos do BBI também em modelos animais de doenças autoimunes, como a esclerose múltipla, e observaram uma redução significativa na inflamação bem como na atenuação de danos neurais (TOUIL et al., 2008; DAI et al., 2011; LI et al., 2011). Portanto, considerando a similaridade estrutural e funcional do BTCl com o BBI é provável que tanto o BTCl quanto o EB de *V. unguiculata*

exercem algum tipo de atividade anti-inflamatória durante o processo de indução tumoral química. Mais experimentos suplementares são necessários para esclarecer esses efeitos.

Os efeitos preventivos observados nos grupos tratados com BTCI ou EB sugerem que esses compostos passaram, pelo menos parcialmente, pela epiderme. Em humanos, a permeabilidade da pele por macromoléculas ou moléculas polares carregadas é baixa (LOMBRY et al., 2000). No entanto, é importante considerar que a pele de camundongos apresenta algumas diferenças com relação à de humanos: ela é mais fina e apresenta um elevado número de folículos pilosos, os quais podem ser utilizados como rotas para a penetração de moléculas (MAGNUSSON et al., 2001). No presente experimento, a pele dos camundongos foi umedecida com água destilada por 2 minutos antes da aplicação tópica das soluções aquosas de BTCI ou EB. Esse pré-tratamento pode ter facilitado a penetração das moléculas, tanto pelos folículos pilosos quanto pelos espaços entre as células da epiderme. Ácidos graxos são amplamente descritos na literatura como facilitadores na penetração de fármacos e outros compostos pela pele (THONG et al., 2007). A presença de ácidos graxos nas amostras de BTCI (Figura 55) e EB também pode ter contribuído para a passagem das moléculas pela pele, especialmente nas fases mais tardias do tratamento, quando a camada epidérmica torna-se mais espessa e o número de folículos pilosos no local das lesões pré-malignas é reduzido.

A atividade anticarcinogênica de inibidores de protease da família Bowman-Birk, no âmbito do tratamento de tumores já estabelecidos, é extensamente documentada na literatura (KENNEDY, 1998 a; KENNEDY, 1998 b; JOANITTI et al., 2006; LOSSO, 2008). Como inibidores dentro de uma mesma família apresentam

características estruturais similares, tais semelhanças abriram perspectivas para que outras moléculas da mesma família pudessem ser investigadas com relação às atividades anticarcinogênicas. Estudos recentes relataram, pela primeira vez, que amostras de BTCI (200  $\mu$ M), membro da família Bowman-Birk, eram capazes de induzir efeitos citotóxicos em células de câncer de mama (MCF-7) sem alterar a viabilidade de células de mama normais (MCF-10A) (JOANITTI, 2008; JOANITTI et al., 2010). O BTCI é capaz de inibir a atividade proteolítica do proteassomo 20S, purificado de células de câncer de mama MCF-7. O proteassomo é um complexo protéico com atividade catalítica importante na degradação de proteínas intracelulares e por meio dessa atividade contribui para a regulação de vias relacionadas à homeostase celular. O BTCI é internalizado por células MCF-7 e colocaliza-se com proteassomos no núcleo e no citoplasma (SOUZA, 2009), sugerindo que os efeitos citotóxicos do inibidor nas células tumorais estariam relacionados à via proteassoma-ubiquitina (SOUZA, 2009). Apesar dessas informações, o mecanismo de ação do BTCI ainda não foi elucidado.

Em estudos *in vitro*, observou-se que o BTCI foi internalizado pelas células de câncer de mama (SOUZA, 2009); porém uma grande proporção desse inibidor permaneceu disperso no meio de cultura sob a forma de agregados (JOANITTI, 2008). Esse resultado sugeriu que a internalização de apenas uma pequena quantidade de BTCI seria suficiente para induzir os efeitos citotóxicos. Outro dado observado foi o fato de muitas amostras de BTCI, com o mesmo perfil de pureza no MALDI-TOF e incubadas na mesma concentração com células MCF-7, mostravam efeitos variados como a redução, manutenção e até mesmo aumento na viabilidade

celular (JOANITTI, 2008). Esse comportamento imprevisível foi inicialmente atribuído ao processo de agregação do BTCI.

A agregação pode ocorrer por diferentes mecanismos e é influenciada por fatores como solvente, pH e temperatura. Um dos mecanismos de agregação propostos para proteínas em seu estado nativo é a auto-associação entre os monômeros induzida pela forma e natureza química da superfície protéica (MAHLER et al., 2009; PHILO et al., 2009). Nesse caso, monômeros tendem a formar oligômeros (menores que 20 nm), como dímeros e trímeros, por ligações não-covalentes entre si. A concentração de proteínas também é um fator determinante, onde concentrações elevadas favorecem a interação entre monômeros e, dependendo do tipo de proteína, leva à formação de oligômeros seguida da formação de agregados (maiores que 20 nm) (MAHLER et al., 2009; PHILO et al., 2009). O BTCI apresenta vários resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos ao solvente o que caracteriza sua superfície como largamente hidrofóbica. Essa superfície é um dos fatores que determina a formação de oligômeros e de agregados do BTCI, principalmente com o aumento da concentração da proteína (VENTURA et al., 1981).

Como relatado acima, postulou-se que a citotoxicidade do BTCI em células MCF-7 era induzida pela inibição do proteassomo e para que tal inibição ocorra é importante que o BTCI seja internalizado pelas células. O BTCI é um inibidor de proteases de baixa massa molecular (9 kDa) que é internalizado pelas células (SOUZA, 2009), mas ainda não se sabe se esse transporte ocorre de forma assistida ou não ou por meio de ligação a algum receptor. Estima-se que o inibidor deva estar em sua forma monomérica ou oligomérica para ser internalizado. O BTCI

em solução, em concentrações elevadas ou na presença de meio de cultura, pode assumir diferentes proporções de formas macromoleculares (monômeros, oligômeros e agregados maiores) e, de certa forma, interferir na internalização dessa molécula. Essa internalização sem um padrão definido pode explicar os efeitos imprevisíveis na viabilidade de células tumorais. Para evitar isso, um dos objetivos do presente trabalho foi testar a entrega do BTCl diretamente no citoplasma das células, por meio de nanoestruturas, visando facilitar a interação do inibidor com seus alvos citoplasmáticos e resultar em efeitos citotóxicos previsíveis e intensificados.

Antes de iniciar o processo de encapsulação do BTCl em alguma nanoestrutura, alguns ensaios visando avaliar o processo de agregação desse inibidor foram realizados. Os dados mostraram que o processo de agregação do BTCl sofre influência da composição, do pH e do tipo de detergente presente no meio (Tabela 2). A diluição de 200  $\mu$ M BTCl em meio de cultura DMEM levou à formação de agregados, independente da presença de soro fetal bovino. No entanto, nessa mesma concentração de BTCl, não foram observados indícios de agregação em água deionizada, solução salina ou PBS. Esse dado explicita a influência dos componentes do meio no processo de agregação desse inibidor. O meio de cultura DMEM é composto basicamente por aminoácidos, vitaminas, glicose e por volta de 7 tipos de sais inorgânicos (INVITROGEN, 2011). A concentração e os tipos de sais influenciam na solubilidade das proteínas e também são fatores determinantes no processo de agregação (ZHANG et al., 2006). Portanto, a combinação dos sais presente no meio DMEM podem ter favorecido a formação de agregados.

Como o BTCl, outras moléculas, principalmente aquelas de uso terapêutico, tem sido investigadas no sentido de encontrar substâncias que possam minimizar o efeito da agregação. Por exemplo, a redução na formação de agregados durante a produção e armazenamento de proteínas terapêuticas, como a insulina, por meio da adição de substâncias anfipáticas é amplamente utilizada na indústria farmacêutica (HAMADA et al., 2009). Moléculas anfipáticas são caracterizadas por apresentar tanto propriedades hidrofílicas quanto hidrofóbicas e estão relacionadas com o aumento na solubilidade e estabilidade de compostos em uma solução (HAMADA et al., 2009). No presente trabalho, foram testadas algumas substâncias anfipáticas, visando a redução na formação de agregados de BTCl e levando, conseqüentemente, à estabilização dessa proteína na forma monomérica/oligomérica.

O copolímero polietilenoglicol-fosfatidiletanolamina (PEG-PE) é uma molécula anfipática que, em soluções aquosas, apresenta a tendência de se auto-organizar em nanoestruturas esféricas (7 a 35 nm) denominadas de micelas (TORCHILIN, 2001; SAWANT & TORCHILIN, 2010). No presente trabalho, o efeito da adição de diferentes cadeias de PEG-PE na agregação do BTCl foi avaliado. A adição de PEG<sub>2000</sub>-PE ou PEG<sub>5000</sub>-PE, a partir da concentração de 0,1 mM, reduziu a formação de agregados de BTCl (200 µM) em meio de cultura DMEM. No entanto, essa concentração de micelas de PEG<sub>2000</sub>-PE, não associadas ao BTCl, induziu efeitos citotóxicos em células de câncer de mama, após incubação por 24 a 72 horas (Figuras 28 e 29).

Como PEG<sub>2000</sub>-PE é uma molécula anfipática, ela pode atuar como um detergente e desestruturar a membrana plasmática de células quando em altas

concentrações. A redução no tempo de incubação das micelas com as células para 6 horas permitiu manter a concentração de PEG-PE (2000 ou 5000 Da) em 0,1 mM sem causar citotoxicidade (Figura 30). Micelas de PEG<sub>2000</sub>-PE são mais utilizadas para a entrega de fármacos, uma vez que a razão de suas porções hidrofílicas e hidrofóbicas favorece uma melhor porcentagem de encapsulação quando comparadas com as de PEG<sub>5000</sub>-PE (LUKYANOV et al., 2002). Como micelas de PEG<sub>2000</sub>-PE e PEG<sub>5000</sub>-PE, não associadas ao BTCI, apresentaram perfis semelhantes com relação à citotoxicidade, decidiu-se prosseguir os estudos utilizando-se micelas PEG<sub>2000</sub>-PE.

O tratamento de células de câncer de mama com BTCI associado ao PEG<sub>2000</sub>-PE não resultou em alterações na viabilidade celular (Figura 31), provavelmente devido a uma interação inadequada das micelas com as células (Figura 32). O mecanismo de associação e internalização das micelas ainda não foi totalmente esclarecido, mas, sabe-se que apesar dessas partículas não atravessarem a membrana plasmática, elas podem ser internalizadas por endocitose (TORCHILIN, 2001; KIM et al., 2010; SAWANT & TORCHILIN, 2010). As micelas de PEG<sub>2000</sub>-PE apresentam carga negativa em sua superfície, devido a presença do polímero PEG, e essa característica tem sido associada à redução na interação das mesmas com células (TORCHILIN, 2001; SAWANT & TORCHILIN, 2010).

Para favorecer e intensificar a interação de macromoléculas e nanoestruturas com a membrana plasmática, peptídeos conhecidos como *cell-penetrating peptides* (CPPs) vêm sendo utilizados (TORCHILIN, 2005; TORCHILIN, 2007). Os CPPs apresentam vários resíduos de aminoácidos carregados positivamente, como lisinas e argininas, conferindo uma carga líquida positiva ao peptídeo (CHOI et al., 2011).



Os mecanismos de penetração ainda estão em discussão, mas sugere-se que cargas positivas dos CPPs associam-se às cargas negativas da membrana plasmática e facilitam a internalização de nanoestruturas por meio da penetração direta através da membrana ou por endocitose (CHOI et al., 2011). Para que essa interação aconteça de forma mais eficiente é preciso que o CPP esteja exposto na superfície da micela. Caso contrário, as cadeias de PEG podem formar um bloqueio estérico e impedir o acesso do peptídeo à membrana plasmática. Uma maneira de se obter tal nanoestrutura é acoplar o peptídeo em copolímeros com cadeia PEG mais longa e inseri-lo na composição de micelas com cadeia PEG mais curta (HASHIZAKI et al., 2003). Os resultados apresentados na figura 33 mostram que a interação de micelas PEG-PE com o uso do CPP TAT em células de câncer de mama foi favorecida. No entanto, como a utilização de co-polímeros com cadeia de PEG menor (750 Da) e a presença da carga positiva do TAT induziram a agregação do BTCl, não foi possível prosseguir os estudos citotóxicos utilizando essa formulação (Figura 34 e Tabela 9).

Uma outra estratégia utilizada para otimizar a internalização de nanoestruturas consiste no acoplamento de anticorpos em sua superfície. O anticorpo monoclonal 2C5 é capaz de reconhecer nucleossomos associados à membrana de células tumorais de diversas origens (ELBAYOUMI et al., 2007). Seu acoplamento na superfície externa de micelas PEG-PE encapsulando a droga paclitaxel resultou em uma melhor interação e, conseqüentemente, maior citotoxicidade da droga após incubação com células tumorais (WANG et al., 2010). No presente trabalho, imunomicelas com PEG-PE e anticorpo 2C5 foram formuladas e sua incubação com BTCl levou à formação de apenas alguns agregados de BTCl

no meio de cultura. Entretanto, o tratamento de células de câncer de mama com BTCI associado às imunomicelas não alterou a viabilidade celular (Figura 36).

Os resultados aqui apresentados mostraram que a associação do BTCI com PEG<sub>2000</sub>-PE (com superfície modificada ou não) reduziu a formação de agregados do inibidor em meio de cultura, mas não favoreceu a citotoxicidade em células tumorais. A formação de micelas se dá por um equilíbrio termodinâmico onde a permanência e estabilidade dos co-polímeros na sua forma monomérica ou micelar depende dos valores de CMC e também das interações com outros compostos (TORCHILIN, 2001; SAWANT & TORCHILIN, 2010). Os dados obtidos sugerem que a interação de PEG-PE com BTCI alterou a estabilidade das micelas ou que o complexo formado entre as duas moléculas não permitiram a associação adequada de PEG-PE para obtenção de micelas estáveis. Nesse sentido, a incubação de micelas de PEG-PE fracamente associadas à moléculas de BTCI com células tumorais pode acarretar em uma interação apenas das moléculas de PEG-PE sem carregar o BTCI nesse processo. Por essas razões, decidiu-se então, tentar encapsular o BTCI em outro sistema de nanoestruturas que fosse termodinamicamente mais estável que as micelas.

A encapsulação de proteínas terapêuticas e outros fármacos em lipossomos é bem estabelecida na literatura. Eles podem ser usados tanto para liberação controlada de fármacos quanto para entregar seu conteúdo diretamente no citoplasma das células (COLLETIER et al., 2002; TORCHILIN, 2008). Considerando essas características e facilidades do uso desse sistema, a encapsulação do BTCI em lipossomos foi investigada e comparada entre várias formulações. Lipossomos catiônicos preparados pelos métodos REV e F / T apresentaram as melhores taxas

de porcentagem de encapsulação do BTCI, carga, tamanho e estabilidade quando comparada com as outras formulações e métodos testados (Tabelas 14 e 15).

Interações eletrostáticas entre a proteína e a superfície lipídica favorece a encapsulação (COLLETIER et al., 2002), como exemplificado pela utilização de fosfolípidios carregados positivamente para melhorar a encapsulação da proteína hirudina, que em pH 7 tem a carga elétrica líquida negativa (MENG et al., 2008). Para favorecer as interações eletrostáticas, a encapsulação foi feita em tampão com força iônica reduzida (MENG et al., 2008). Similarmente à hirudina, o BTCI tem o ponto isoelétrico baixo (4,3) e apresenta carga elétrica líquida negativa em pH 7. A utilização de PBS diluído (força iônica menor) e do fosfolípido DOTAP (carregado positivamente) resultou em aumento na porcentagem de encapsulação de BTCI em aproximadamente quatro vezes (Tabela 14).

Além de aumentar a porcentagem de encapsulação, os lipossomos catiônicos, apresentam a vantagem de aderir à membrana plasmática de células (que tem carga negativa) por interações eletrostáticas e facilitar a entrega de seu conteúdo. Desde seu primeiro uso, em 1987, inúmeros lipossomos catiônicos vêm sendo produzidos e utilizados para a entrega de macromoléculas como RNAs, DNAs, peptídeos e proteínas *in vitro*, *in vivo* e em ensaios clínicos (LONEZ et al., 2008). Experimentos de citometria de fluxo mostraram que a interação de lipossomos catiônicos de BTCI com células de câncer de mama foi diretamente proporcional à concentração de lipídios (Figura 42). Essa interação foi observada tanto com relação aos lipossomos quanto com relação ao BTCI (Figuras 43). No entanto, nenhuma alteração na viabilidade celular foi observada (Figura 44). Considerando que esses resultados possam ter ocorrido devido à baixa

concentração de BTCI entregue por lipossomos catiônicos, outra estratégia consistindo no acoplamento de ligantes na superfície dos lipossomos foi empregada.

A transferrina é uma glicoproteína conhecida por transportar ferro, o qual é um composto indispensável para a divisão celular (MACEDO et al., 2008). A super-expressão de receptores de transferrina foram observadas em células tumorais de câncer de mama (MCF-7) e de colo do útero (Hela) (MACEDO et al., 2008). Portanto, o acoplamento de transferrina na superfície de lipossomos é uma estratégia interessante para aumentar a associação dessas nanoestruturas com as células tumorais. No presente trabalho, diferentes proporções de transferrina (Tf-PE) resultaram em nanoestruturas com tamanho e potencial zeta variados (Tabela 21). O papel da transferrina na interação com as células foi observado em ensaios de competição, quando a adição prévia de transferrina livre reduziu a interação dos lipossomos Tf-PE (Figura 46). Segundo ensaios realizados por citometria de fluxo, a interação nas células MCF-7 foi mais eficiente com lipossomos 0,5% Tf-PE do que com os lipossomos catiônicos, sem Tf-PE, enquanto que na linhagem Hela o resultado foi o oposto (Figuras 45 e 46). Esses resultados, apesar de preliminares, indicam que essas linhagens apresentam potencial de membrana celular e/ou expressão de receptores de transferrina diferenciados. O tratamento de células MCF-7 e Hela com os lipossomos, com ou sem 0,5% Tf-PE, e encapsulando BTCI não resultaram em alteração significativa na viabilidade celular (Figura 47).

Lipossomos são internalizados pelas células por meio de diferentes mecanismos, sendo que o principal deles é a endocitose (KHALIL et al., 2006). A endocitose é um processo dependente de energia e consiste na internalização, acionada pela ligação a receptores ou interações eletrostáticas, de macromoléculas/

nanoestruturas em vesículas endossomais. Os endossomos passam por etapas de maturação (redução do pH) seguido da fusão dos mesmos com lisossomos, onde ocorre a degradação enzimática de seu conteúdo (KHALIL et al., 2006). A degradação do conteúdo dos lipossomos por enzimas lisossomais é potencialmente prejudicial para a atividade das macromoléculas encapsuladas em seus alvos citoplasmáticos (BARU et al., 1998; HASEGAWA et al., 2001). A fim de evitar a degradação pelo lisossomo, a incorporação de moléculas carregadas positivamente na composição dos lipossomos tem sido utilizada. Nessas condições, essas nanoestruturas se fundem com a membrana dos endossomos e liberam seu conteúdo diretamente no citoplasma das células, evitando a degradação pelas enzimas do lisossomo (KHALIL et al., 2006). O destino intracelular final dos lipossomos, com ou sem 0,5% Tf-PE, foi examinado visando avaliar os efeitos intracelulares do conteúdo lipossomal encapsulado.

Na linhagem Hela, parte dos lipossomos sem Tf-PE co-localizaram com lisossomos (Figura 49 e Tabela 22). A interação dos lipossomos com 0,5% Tf-PE foi menor e esses localizaram-se principalmente na superfície das células, corroborando com os dados obtidos anteriormente por ensaios de citometria de fluxo (Figura 45 e 46). Na linhagem MCF-7, os lipossomos com 0,5% Tf-PE organizaram-se em forma de agregados na superfície das células e apresentaram internalização não-uniforme de moléculas de BTCl. Notou-se também que os lipossomos sem Tf-PE não estavam co-localizados com lisossomos, mas as moléculas de BTCl sim (Figura 48 e Tabela 22). A não co-localização dos lipossomos sugere que o destino final dos mesmos não foi para os lisossomos e que a liberação do seu conteúdo pode ter ocorrido diretamente no citoplasma. Proteínas

presentes no citoplasma das células podem associar-se aos seus alvos citoplasmáticos e/ou serem degradadas (CIECHANOVER, 2012). Nesse contexto, esses dados sugerem que o BTCI pode ter sido direcionado para os lisossomos, por algum mecanismo desconhecido, e degradado por essa organela. Mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo e o tráfego intracelular de moléculas de BTCI.

De acordo com os resultados apresentados acima, a hipótese de que a entrega de BTCI diretamente no citoplasma da célula tumoral otimizaria seus efeitos citotóxicos não foi confirmada. Com base nesses dados, foi questionado se a presença de algum outro composto nas amostras de BTCI poderia ser o responsável pela citotoxicidade observada em estudos anteriores (JOANITTI, 2008; SOUZA, 2009; JOANITTI et al., 2010). Essa citotoxicidade poderia ser exercida pelo composto isoladamente ou de forma sinérgica com o BTCI e resultar no efeito citotóxico em células de câncer de mama.

Sementes de *V. unguiculata* apresentam diversos componentes de natureza protéica, lipídica ou glicídica (THANGADURAI, 2005). No presente trabalho, a pureza de todas as amostras de BTCI foi avaliada por MALDI-TOF após a cromatografia (Figura 15). Segundo essas análises, apenas o pico referente ao BTCI foi observado, ou seja, as amostras foram consideradas puras. O MALDI-TOF é extremamente sensível na determinação acurada da massa molecular e na identificação de peptídeos e proteínas. Apesar disso, a detecção de alguns compostos por essa técnica pode variar consideravelmente de acordo com: o tipo de matriz e solventes utilizados na preparação da amostra; concentração da amostra; e de propriedades estruturais e funcionais do próprio composto a ser analisado

(LUBEC et al., 2007). Por exemplo, a identificação de ácidos graxos e flavonóides (moléculas de baixa massa molecular) por MALDI-TOF utilizando matrizes convencionais como CHCA (*a-cyano-4-hydroxycinnamic acid*) ou DHB (*2,5-dihydroxybenzoic acid*) é difícil, uma vez que os sinais da matriz e das amostras se sobrepõem dificultando a avaliação dos dados (FUCHS et al., 2010). Portanto, como a matriz CHCA foi utilizada na caracterização das amostras de BTCl, é possível que outras moléculas possam ter sido eluídas juntamente com a proteína de interesse e não foram detectadas pelo MALDI-TOF, por estarem presentes em baixas concentrações ou devido a natureza da molécula.

Diferentes amostras de BTCl livre mostraram diferenças quanto a citotoxicidade em células MCF-7 (Figura 50), mesmo apresentando o mesmo perfil de pureza previamente determinado por MALDI-TOF (Figura 15). Esses resultados não foram atribuídos às possíveis diferenças no perfil protéico, nem tão pouco às variações na atividade de inibição de tripsina e quimotripsina, uma vez que nenhuma diferença foi encontrada entre elas (Figuras 51 a 54). As amostras foram então analisadas quanto à presença de moléculas de natureza lipídica e verificou-se que todas continham ácidos graxos (Figura 55). A co-eluição de ácidos graxos e proteínas em cromatografias de amostras naturais é um evento relativamente comum. Em geral, as resinas biopoliméricas (agarose ou celulose), utilizadas na cromatografia de proteínas, favorecem a adsorção não específica de lipídios (GARDNER, 1996). Por exemplo, durante a cromatografia de proteínas presentes no leite ou no plasma, ácidos graxos podem ser co-eluídos com frações de proteínas (GARDNER, 1996). Para evitar isso, o leite ou plasma passam por um pré-tratamento de delipidação para remover a maior quantidade de lipídios possíveis antes

de ser cromatografado (GARDNER, 1996). Sementes de *V. unguiculata* são ricas em ácidos graxos (FROTA et al., 2008) e esses lipídios são removidos das sementes durante a obtenção do EB, nas etapas de precipitações e centrifugações. No entanto, os resultados aqui apresentados mostraram que ácidos graxos, em quantidades variadas, ainda estavam presentes nos diferentes lotes de EB e de BTCl.

A amostra de BTCl que apresentou citotoxicidade em células MCF-7 foi a que continha menor quantidade de ácido graxos (~ 30 µM). O aumento na viabilidade celular em relação ao controle, observado em algumas amostras de BTCl, pode ter ocorrido devido à utilização desses ácidos graxos pelas células MCF-7 como fonte de energia. No entanto, não foi possível avaliar se a redução na concentração de ácidos graxos presentes nas amostras implicaria em uma maior atividade anticarcinogênica, uma vez que, além da quantidade, os tipos de ácidos graxos podem influenciar na atividade de proteínas. Por exemplo, a associação da proteína do leite  $\alpha$ -lactalbumina bovina com ácido oléico ou linoléico (insaturados) resultam em citotoxicidade para células tumorais; já essa associação com ácido esteárico (saturado) não altera a viabilidade celular (ZHANG et al., 2009).

Adicionalmente, a presença de ácidos graxos poderia estar relacionada com o processo de agregação do BTCl em meio de cultura. Ácidos graxos podem interagir com resíduos hidrofóbicos de proteínas e propiciar a formação de agregados, como já foi reportado para a  $\alpha$ -lactalbumina bovina (ZHANG et al., 2009). Considerando que o BTCl apresenta superfície hidrofóbica formada por vários resíduos de aminoácidos expostos ao solvente, a interação de ácidos graxos com esses resíduos pode acontecer, o que poderia favorecer a formação de agregados do



BTCl. Essa interação pode explicar as diferenças observadas na citotoxicidade das amostras de BTCl contra as células de câncer de mama.

Outra hipótese para variações na citotoxicidade entre amostras de BTCl seria a presença de compostos do metabolismo secundário das plantas, como os polifenóis. Esses compostos podem associar-se a proteínas ligando-se preferencialmente a resíduos de triptofano, cisteína, lisina e grupamentos amino livres, por interações do tipo de hidrogênio, iônicas e hidrofóbicas. Nem sempre ocorre mudança na estrutura secundária ou terciária da proteína após a interação, no entanto, os polifenóis podem induzir ligações cruzadas entre as moléculas de proteína e alterar sua carga e solubilidade (RAWEL et al., 2002; PAPADOPOULOU et al., 2005). RAWEL e colaboradores (2002), mostraram que alguns polifenóis podem se associar a proteínas da soja, inclusive a inibidores de protease da família Bowman-Birk. Além disso, os polifenóis, dentre eles as isoflavonas, são amplamente descritos por seus efeitos anticarcinogênicos, antioxidantes e antimicrobianos (MIDDLETON et al., 2000; JOANITTI et al., 2011). Portanto, é necessário investigar se a ausência ou presença de polifenóis ligados ao BTCl pode estar relacionada às variações na citotoxicidade entre as amostras. A presença de populações de BTCl com diferentes moléculas associadas deve ser investigada a fim de avaliar as hipóteses levantadas.

O estudo ora apresentado mostra os efeitos do BTCl e do EB de sementes de *V. unguiculata* na área de oncologia. Com relação aos efeitos na viabilidade celular, dados preliminares desse trabalho evidenciam que há variações no perfil de pureza de amostras de BTCl e que essas diferenças podem estar relacionadas com a atividade citotóxica em células de câncer. É importante ressaltar que estudos anteriores mostraram a redução da proliferação e a indução da morte de células de

câncer de mama após tratamento com BTCl. Além disso, esses efeitos citotóxicos foram específicos para as células tumorais, uma vez que não foram observadas alterações na viabilidade de células de mama normais (JOANITTI, 2008; JOANITTI et al., 2010). Esses resultados são promissores e mostram o potencial das amostras de BTCl no tratamento de câncer. Portanto, estudos visando esclarecer as moléculas e os mecanismos de ação envolvidos nesse efeito são necessários para estabelecer essas amostras como agentes anticarcinogênicos e investigar o futuro emprego das mesmas em tratamentos contra o câncer de mama.

Com relação aos efeitos preventivos, os resultados obtidos no modelo animal de câncer de pele não-melanoma sugerem que o BTCl e o EB de sementes de *V. unguiculata* são capazes de retardar a progressão desse tipo de câncer, provavelmente exercendo efeitos anti-inflamatórios. Os dados aqui apresentados também permitem concluir, pela primeira vez, que o BTCl e o EB são importantes compostos na prevenção de câncer de pele não-melanoma e abrem perspectivas para estudar seus efeitos em lesões tumorais de outras áreas. Os resultados também apontam um possível efeito anti-inflamatório exercido pelas amostras de BTCl e EB. A confirmação desse novo dado pode ampliar o espectro de atividades e aplicações desses compostos, se estendendo não só à prevenção de câncer, mas também podendo atuar na redução de processos inflamatórios. Estudos adicionais são necessários para melhor esclarecer os mecanismos de ação, a concentração efetiva, os efeitos anti-inflamatórios e a investigação da identidade e interações sinérgicas de outras moléculas presentes no EB. Tais investigações serão muito úteis para auxiliar no desenho de novas estratégias preventivas no tratamento de

câncer de pele não-melanoma e também de outras doenças relacionadas às inflamações agudas ou crônicas.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1) O BTCl e o extrato de sementes de *Vigna unguiculata* apresentaram efeitos preventivos contra câncer de pele não-melanoma reduzindo: a incidência e o volume de lesões pré-malignas; a frequência de alterações histopatológicas; a proliferação celular e a produção de COX-2.

2) O extrato de sementes de *V. unguiculata* apresentou o melhor efeito preventivo contra câncer de pele não-melanoma, provavelmente devido à mecanismos de sinergia entre o BTCl e as outras proteínas que o compõe.

3) A associação do BTCl (200  $\mu$ M) com micelas, compostas por 0,1 mM de PEG<sub>2000</sub>-PE ou de PEG<sub>5000</sub>-PE, reduziu a formação de agregados do inibidor em meio de cultura.

4) A modificação da superfície das micelas, com a adição do peptídeo TAT ou do anticorpo monoclonal 2C5, intensificou a interação das micelas, mas não favoreceu a citotoxicidade em células de câncer de mama.

5) Lipossomos catiônicos, preparados pelo método de evaporação de fase reversa (REV), reduziram a agregação do BTCl em meio de cultura e aumentaram a taxa de encapsulação do inibidor, sem alterar a atividade inibitória do mesmo.

6) A presença de cargas positivas na superfície dos lipossomos aumentou a associação e internalização das nanopartículas em células MCF-7 e Hela; enquanto

que a presença de transferrina (0,5% Tf-PE) na superfície dos lipossomos induziu a agregação das nanopartículas, resultando na redução da internalização nessas células.

7) As moléculas de BTCl liberadas, por lipossomos catiônicos, no citoplasma das células MCF-7 apresentaram-se co-localizadas com lisossomos e não induziram citotoxicidade nessas células.

8) Amostras de BTCl livre com diferentes efeitos citotóxicos apresentaram semelhanças quanto ao perfil protéico, mas diferenças quanto à concentração de ácidos graxos. Esses resultados indicam que é preciso investigar a influencia dos ácidos graxos na citotoxicidade do BTCl.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Declaração do comitê de ética no uso animal (CEUA)



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 27 de setembro de 2011.



#### **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado **“EFEITOS DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DE SEMENTES DE VIGNA UNGUICULATA E DE UM PEPTÍDEO DERIVADO, ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMOS, NO TRATAMENTO PREVENTIVO E TERAPÊUTICO DE CÂNCER DE MAMA E DE PELE .”**, UnBDOC n.º 108774/2010, sob responsabilidade do Prof. Ricardo Bentes de Azevedo, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



  
Profa. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora do CEUA

## 8.2 Carta de avaliação do doutorado sanduíche

Parte do presente trabalho foi realizado durante o período de 1 ano de doutorado sanduíche na *Northeastern University* (Boston, EUA) sob a supervisão do Dr. Vladimir Torchilin, o qual redigiu a carta de avaliação abaixo:



# Northeastern

January 20, 2012

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

To whom it may concern

This letter is prepared to evaluate Ms. Graziella Joanitti, who was working in my laboratory in 2011.

Vladimir P. Torchilin  
Ph.D., D.Sc.,  
Distinguished Professor  
Director, Center for  
Pharmaceutical  
Biotechnology and  
Nanomedicine  
*Department of  
Pharmaceutical Science  
School of Pharmacy  
Bourne College  
of Health Sciences  
312 Mugar Life  
Sciences Building  
360 Huntington Ave.  
Boston, MA 02115  
617-373-3206  
f 617-373-7599  
v.torchilin@neu.edu*

Ms. Joanitti from the University of Brazilia was staying in my Center for Pharmaceutical Biotechnology and Nanomedicine for one year in 2011 as a visiting graduate student. During her stay, she was working on the topic associated loading proteins and small molecule drugs into liposomes to prepare optimized forms for future medical use.

Graziella has shown herself as an outstanding young scientist with excellent education and great interest in working in research. She is unexpectedly very mature for her age and level of experience, and was working on the level of a good postdoc. She is able to perform well planned independent experiments, analyze data, and suggest very reasonable future research plans. She is also very responsible and well organized. Her ability to communicate with other members of the lab and work as a team player was also excellent.

Summarizing, I can put Graziella Joanitti into top 5% among many dozens of students I was supervising over the years. I am absolutely certain that she has a very bright future as a scientist.

Sincerely,

Vladimir Torchilin, Ph.D., D.Sc.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALLEN, T. M., SAPRA, P. e MOASE, E. Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7, p. 889–894, 2002.

ARMSTRONG, W. B., KENNEDY, A. R., WAN, X. S., TAYLOR, T. H., NGUYEN, Q. A., JENSEN, J., THOMPSON, W., LAGERBERG, W. e MEYSKENS, F. L., JR. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 4684-91, 2000.

AZAM, F., MEHTA, S. e HARRIS, A. L. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. **European Journal of Cancer**, v. 46, p. 1323-32, 2010.

BARBOSA, J. A., SILVA, L. P., TELES, R. C., ESTEVES, G. F., AZEVEDO, R. B., VENTURA, M. M. e DE FREITAS, S. M. Crystal structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 1638-50, 2007.

BARU, M., NAHUM, O., JAARO, H., SHA'ANANI, J. e NUR, I. Lysosome-disrupting peptide increases the efficiency of in-vivo gene transfer by liposome-encapsulated DNA. **Journal of Drug Targeting**, v. 6, p. 191-9, 1998.

BEIGNON, A. S., BRIAND, J. P., MULLER, S. e PARTIDOS, C. D. Immunization onto bare skin with heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* enhances immune responses to coadministered protein and peptide antigens and protects mice against lethal toxin challenge. **Immunology**, v. 102, p. 344-51, 2001.

BILLINGS, P. C., ST CLAIR, W. H., MAKI, P. A. e KENNEDY, A. R. Distribution of the Bowman Birk protease inhibitor in mice following oral administration. **Cancer Letters**, v. 62, p. 191-7, 1992.

BIORAD. Silver staining troubleshooting. Disponível em: [http://www.biorad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9056.pdf](http://www.biorad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9056.pdf), acessado em 12 de fevereiro de 2012.

BODE, W. e HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 241-52, 2000.

BRENTANI, M. M., COELHO, F. R. G., KOWALSKI, L. P. **Bases da oncologia**. São Paulo: Tecmedd, 2003. 452 p.

CARLINI, C. R. e GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-39, 2002.

CELLA, D., FALLOWFIELD, L., BARKER, P., CUZICK, J., LOCKER, G. e HOWELL, A. Quality of life of postmenopausal women in the ATAC ("Arimidex", tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for early breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 100, p. 273-84, 2006.



- CHEN, Y. W., HUANG, S. C., LIN-SHIAU, S. Y. e LIN, J. K. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1296-306, 2005.
- CHIPUK, J. E. e GREEN, D. R. Dissecting p53-dependent apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, p. 994-1002, 2006.
- CHO, K., WANG, X., NIE, S., CHEN, Z. G. e SHIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 1310-6, 2008.
- CHOI, Y. S., LEE, J. Y., SUH, J. S., LEE, S. J., YANG, V. C., CHUNG, C. P. e PARK, Y. J. Cell penetrating peptides for tumor targeting. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 1166-82, 2011.
- CIECHANOVER, A. Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. **Medicina (B Aires)**, v. 70, p. 105-19, 2011.
- CLEMENTE, A. e DOMONEY, C. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. **Current Protein & Peptide Science**, v. 7, p. 201-16, 2006.
- CLEMENTE, A., MORENO, F. J., MARIN-MANZANO MDEL, C., JIMENEZ, E. e DOMONEY, C. The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 396-405, 2009.
- COLLETIER, J. P., CHAIZE, B., WINTERHALTER, M. e FOURNIER, D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. **BMC Biotechnology**, v. 2, p. 9, 2002.
- DAI, H., CIRIC, B., ZHANG, G. X. e ROSTAMI, A. Bowman-Birk Inhibitor attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by delaying infiltration of inflammatory cells into the CNS. **Immunology Research**, v. 51, p. 145-52, 2011.
- DANIELS, T. R., DELGADO, T., HELGUERA, G. e PENICHER, M. L. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. **Clinical Immunology**, v. 121, p. 159-76, 2006.
- DITTMANN, K. H., MAYER, C. e RODEMANN, H. P. Radioprotection of normal tissue to improve radiotherapy: the effect of the Bowman Birk protease inhibitor. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 3, p. 360-3, 2003.
- DLUGOSZ, A., MERLINO, G. e YUSPA, S. H. Progress in cutaneous cancer research. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 7, p. 17-26, 2002.
- DURANTI, M. e GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, p. 31-45, 1997.
- ELBAYOUMI, T. A., PABBA, S., ROBY, A. e TORCHILIN, V. P. Antinucleosome antibody-modified liposomes and lipid-core micelles for tumor-targeted delivery of therapeutic and diagnostic agents. **J Liposome Research**, v. 17, p. 1-14, 2007.

- FACHETTI, H. C. S., MIZUTA, K. e VENTURA, M. M. Thermodynamics of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, p. 311–317, 1984.
- FAROKHZAD, O. C., CHENG, J., TEPLY, B. A., SHERIFI, I., JON, S., KANTOFF, P. W., RICHIE, J. P. e LANGER, R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, p. 6315-20, 2006.
- FAROKHZAD, O. C. e LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, p. 16-20, 2009.
- FEAR, G., KOMARNYTSKY, S. e RASKIN, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 354-68, 2007.
- FENG, R., HE, W., LIU, Q. e OCHI, H. Age-Related Susceptibility of Chemical Carcinogenesis in BALB/c Mice. **Journal of Anti-Aging Medicine**, v. 5, p. 283-288, 2002.
- FERNANDES, A. O. e BANERJI, A. P. Long-term feeding of field bean protein containing protease inhibitors suppresses virus-induced mammary tumors in mice. **Cancer Letters**, v. 116, p. 1-7, 1997.
- FILLER, R. B., ROBERTS, S. J. e GIRARDI, M. Cutaneous two-stage chemical carcinogenesis. **CSH Protocols**, v. 2007, p. pdb prot4837, 2007.
- FREITAS, S. M., DE MELLO, L. V., DA SILVA, M. C., VRIEND, G., NESHICH, G. e VENTURA, M. M. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. **FEBS Letters**, v. 409, p. 121-7, 1997.
- FREITAS, S. M., IKEMOTO, H. e VENTURA, M. M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCl). **Journal of Protein Chemistry**, v. 18, p. 307-13, 1999.
- FROTA, K. D. M. G., SOARES, R. A. M. e ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos - Campinas**, v. 28, p. 470-476, 2008.
- FUCHS, B., SUSS, R. e SCHILLER, J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. **Progress in Lipid Research**, v. 50, p. 132, 2011.
- FUJIKI, H., SUGANUMA, M., YOSHIZAWA, S., KANAZAWA, H., SUGIMURA, T., MANAM, S., KAHN, S. M., JIANG, W., HOSHINA, S. e WEINSTEIN, I. B. Codon 61 mutations in the c-Harvey-ras gene in mouse skin tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene plus okadaic acid class tumor promoters. **Molecular Carcinogenesis**, v. 2, p. 184-7, 1989.
- GABIZON, A. A., MUGGIA, F. M. Long circulating liposomes: old drugs, new therapeutics. Springer-Verlag and Landes Bioscience, 1998. 302 p.
- GARDNER, T. C. Delipidation Treatments for Large-Scale Protein Purification Processing. Master of science in chemical engineering. Virginia Polytechnic Institute and State University. 1996.
- GREGORIADIS, G. **Liposome Technology**. New York: Informa Healthcare, 2006. 1240 p.
- GREGORIADIS, G., MCCORMACK, B., OBRENOVIC, M., SAFFIE, R., ZADI, B. e PERRIE, Y. Vaccine entrapment in liposomes. **Methods**, v. 19, p. 156-62, 1999.

GLOBOCAM. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>, acessado em 12 de fevereiro de 2012.

HALEY, B. e FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology**, v. 26, p. 57-64, 2008.

HAMADA, H., ARAKAWA, T. e SHIRAKI, K. Effect of additives on protein aggregation. **Current Pharmaceutical Biotechnology** v. 10, p. 400-7, 2009.

HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-74, 2011.

HASEGAWA, S., HIRASHIMA, N. e NAKANISHI, M. Microtubule involvement in the intracellular dynamics for gene transfection mediated by cationic liposomes. **Gene Therapy**, v. 8, p. 1669-73, 2001.

HASHIZAKI, K., TAGUCHI, H., ITOH, C., SAKAI, H., ABE, M., SAITO, Y. e OGAWA, N. Effects of poly(ethylene glycol) (PEG) chain length of PEG-lipid on the permeability of liposomal bilayer membranes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 51, p. 815-20, 2003.

HSIEH, C. C., HERNANDEZ-LEDESMA, B., JEONG, H. J., PARK, J. H. e DE LUMEN, B. O. Complementary roles in cancer prevention: protease inhibitor makes the cancer preventive peptide lunasin bioavailable. **PLoS One**, v. 5, p. e8890, 2010.

IGNEY, F. H. e KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 277-88, 2002.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Ministério da Saúde. Situação do Câncer no Brasil – 2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/situacao/>, acessado em 12 de fevereiro de 2012.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/situacao/>, acessado em 12 de fevereiro de 2012.

INVITROGEN. Composição do DMEM. Disponível em: [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media\\_formulation.1.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.1.html), acessado em 12 de janeiro de 2012.

IRIGARAY, P., NEWBY, J. A., CLAPP, R., HARDELL, L., HOWARD, V., MONTAGNIER, L., EPSTEIN, S. e BELPOMME, D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 640-58, 2007.

JOANITTI, G.A. Efeito citostático e citotóxico do inibidor de proteases - BTCl - e peptídeos derivados em células de câncer de mama (MCF-7). Dissertação de Mestrado em Biologia Animal - Universidade de Brasília. 2008.

JOANITTI, G. A., AZEVEDO, R. B. e 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**, v. 293, p. 73-81, 2010.

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

JOANITTI, G. A.; FREITAS, S. M. ; AZEVEDO, R. B. **Legume-Derived Compounds for the Prevention and Treatment of Breast Cancer**. Em: Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities. Esra Gunduz; Mehmet Gunduz. Croácia: InTech - Open Access Publisher, 2011, p.319 a 344.

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

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

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

KENNEDY, A. R., BILLINGS, P. C., WAN, X. S. e NEWBERNE, P. M. Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 43, p. 174-86, 2002.

KHALIL, I. A., KOGURE, K., AKITA, H. e HARASHIMA, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 32-45, 2006.

KIM, S., SHI, Y., KIM, J. Y., PARK, K. e CHENG, J. X. Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, in vivo stability, and micelle-cell interaction. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, p. 49-62, 2010.

KIM, S. C., KIM, D. W., SHIM, Y. H., BANG, J. S., OH, H. S., WAN KIM, S. e SEO, M. H. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 72, p. 191-202, 2001.

KIRBY, C. e GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for highyield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, v. 2, p. 979-984, 1984.

KOREN, E., APTE, A., JANI, A. e TORCHILIN, V. P. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, v., p., 2011.

LANE, D. Designer combination therapy for cancer. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 163-4, 2006.

LAPINSKI, M. M., CASTRO-FORERO, A., GREINER, A. J., OFOLI, R. Y. e BLANCHARD, G. J. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. **Langmuir**, v. 23, p. 11677-83, 2007.

LI, J., YE, L., COOK, D. R., WANG, X., LIU, J., KOLSON, D. L., PERSIDSKY, Y. e HO, W. Z. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor inhibits neurotoxicity of LPS-activated macrophages. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 15, 2011.

LOIKE, J. D. e SILVERSTEIN, S. C. A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red blood cells in phagocytosing murine macrophages. **Journal of Immunological Methods**, v. 57, p. 373-9, 1983.

LOMBRY, C., DUJARDIN, N. e PREAT, V. Transdermal delivery of macromolecules using skin electroporation. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 32-7, 2000.

- LONEZ, C., VANDENBRANDEN, M. e RUYSSCHAERT, J. M. Cationic liposomal lipids: from gene carriers to cell signaling. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 340-7, 2008.
- LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 94-118, 2008.
- LUBEC, G. e AFJEHI-SADAT, L. Limitations and pitfalls in protein identification by mass spectrometry. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 3568-84, 2007.
- LUKYANOV, A. N., GAO, Z., MAZZOLA, L. e TORCHILIN, V. P. Polyethylene glycol-diacyl lipid micelles demonstrate increased accumulation in subcutaneous tumors in mice. **Pharmaceutical Research**, v. 19, p. 1424-9, 2002.
- MACEDO, M. F. e DE SOUSA, M. Transferrin and the transferrin receptor: of magic bullets and other concerns. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 7, p. 41-52, 2008.
- MADAN, V., LEAR, J. T. e SZEIMIES, R. M. Non-melanoma skin cancer. **Lancet**, v. 375, p. 673-85, 2010.
- MAGNUSSON, B. M., WALTERS, K. A. e ROBERTS, M. S. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 205-27, 2001.
- MAHLER, H. C., FRIESS, W., GRAUSCHOPF, U. e KIESE, S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 2909-34, 2009.
- MALAM, Y., LOIZIDOU, M. e SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, p. 592-9, 2009.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 143-8, 2002.
- MEERAN, S. M., VAID, M., PUNATHIL, T. e KATIYAR, S. K. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-caused skin tumor promotion in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated mouse skin, which is associated with the inhibition of inflammatory responses. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 520-8, 2009.
- MENG, M., LIU, Y., WANG, Y. B., WANG, J. C., ZHANG, H., WANG, X. Q., ZHANG, X., LU, W. L. e ZHANG, Q. Increase of the pharmacological and pharmacokinetic efficacy of negatively charged polypeptide recombinant hirudin in rats via parenteral route by association with cationic liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 113-9, 2008.
- MIDDLETON, E., JR., KANDASWAMI, C. e THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-751, 2000.
- MORHY, L. e VENTURA, M. M. The complete amino acid sequence of the Vigna unguiculata (L.) Walp seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, p. 71-81, 1987.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. e SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 215-34, 2000.

NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). What do you need to know about breast cancer. NIH Publication, n. 05-1556, 2005.

NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). What do you need to know about skin cancer. NIH Publication, n. 10-7625, 2009.

NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). Cancer Prevention Overview. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/prevention>, acessado em 12 de fevereiro de 2012.

PANDEY, R., PATIL, N. e RAO, M. Proteases and Protease Inhibitors: Implications in Antitumorigenesis and Drug Development. **International Journal of Human Genetics**, v. 7, p. 67-82, 2007.

PAPADOPOULOU, A., GREEN, R. J. e FRAZIER, R. A. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 158-63, 2005.

PARK, J. H., JEONG, H. J. e DE LUMEN, B. O. Contents and bioactivities of lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7686-90, 2005.

PHILO, J. S. e ARAKAWA, T. Mechanisms of protein aggregation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p. 348-51, 2009.

QI, R. F., SONG, Z. W. e CHI, C. W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)**, v. 37, p. 283-92, 2005.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RAWEL, H. M., CZAJKA, D., ROHN, S. e KROLL, J. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 137-50, 2002.

SA, V. C., SILVA, T. A., REIS, C. M., CUNHA, F. Q., FIGUEIREDO, F. e BOCCA, A. L. The pattern of immune cell infiltration in chromoblastomycosis: involvement of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 and fungi persistence. **Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 49, p. 49-53, 2007.

SAAD, M., GARBUZENKO, O. B., BER, E., CHANDNA, P., KHANDARE, J. J., POZHAROV, V. P. e MINKO, T. Receptor targeted polymers, dendrimers, liposomes: which nanocarrier is the most efficient for tumor-specific treatment and imaging? **Journal of Controlled Release**, v. 130, p. 107-14, 2008.

SAIF, M. W., PODOLTSEV, N. A., RUBIN, M. S., FIGUEROA, J. A., LEE, M. Y., KWON, J., ROWEN, E., YU, J. e KERR, R. O. Phase II clinical trial of paclitaxel loaded polymeric micelle in patients with advanced pancreatic cancer. **Cancer Investigation**, v. 28, p. 186-94, 2010.

SAITO, T., SATO, H., VIRGONA, N., HAGIWARA, H., KASHIWAGI, K., SUZUKI, K., ASANO, R. e YANO, T. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. **Cancer Letters**, v. 253, p. 249-57, 2007.

SAKURAI, N., SUZUKI, K., SANO, Y., SAITO, T., YOSHIMURA, H., NISHIMURA, Y., YANO, T., SADZUKA, Y. e ASANO, R. Effects of a single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate on anti-proliferation and inhibition of metastasis in M5076 ovarian sarcoma-bearing mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 1, p. 903-7, 2008.

SAWANT, R. R. e TORCHILIN, V. P. Multifunctionality of lipid-core micelles for drug delivery and tumour targeting. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, p. 232-46, 2010.

SCITABLE by Nature Education. Disponível em: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-membranes-14052567>, acessado em 12 de fevereiro de 2012.

SILVA, L. P., AZEVEDO, R. B., MORAIS, P. C., VENTURA, M. M. e FREITAS, S. M. Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. **Proteins**, v. 61, p. 642-8, 2005.

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

SLEDGE, G. W., JR. Breast cancer in the clinic: treatments past, treatments future. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, p. 487-95, 2001.

Souza, L. Efeito de um inibidor de serinoproteases em proteossomas de linhagens de células cancerígenas. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) - Universidade de Brasília. 2009.

SSAP Server. Disponível em: <http://protein.hbu.cn/cath/cathwww.biochem.ucl.ac.uk/cgi-bin/cath/GetSsapRasmol.html>, acessado em 12 de janeiro de 2012.

STEWART, J. C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrocyanide. **Analytical Biochemistry**, v. 104, p. 10-4, 1980.

SZEIMIES, R. M. e KARRER, S. Towards a more specific therapy: targeting nonmelanoma skin cancer cells. **British Journal of Dermatology**, v. 154 Suppl 1, p. 16-21, 2006.

SZOKA, F., JR. e PAPAHADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). **Annual Review of Biophysics & Bioengineering**, v. 9, p. 467-508, 1980.

TANG, M., ASAMOTO, M., OGAWA, K., NAIKI-ITO, A., SATO, S., TAKAHASHI, S. e SHIRAI, T. Induction of apoptosis in the LNCaP human prostate carcinoma cell line and prostate adenocarcinomas of SV40T antigen transgenic rats by the Bowman-Birk inhibitor. **Pathology International**, v. 59, p. 790-6, 2009.

THANGADURAI, D. Chemical composition and nutritional potential of vigna unguiculata ssp. Cylindrica (fabaceae). **Journal of Food Biochemistry** v. 29, p. 88-98, 2005.

THONG, H. Y., ZHAI, H. e MAIBACH, H. I. Percutaneous penetration enhancers: an overview. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 20, p. 272-82, 2007.

THUN, M. J., DELANCEY, J. O., CENTER, M. M., JEMAL, A. e WARD, E. M. The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 100-10, 2010.

- TOMAYKO, M. M. e REYNOLDS, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 24, p. 148-54, 1989.
- TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 4, p. 145-160, 2005.
- TORCHILIN, V. P. Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics. **Drug Discovery Today: Technologies** v. 5, p. e95 - e103, 2008.
- TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 137-72, 2001.
- TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **Aaps Journal**, v. 9, p. E128-47, 2007.
- TORCHILIN, V. P., LUKYANOV, A. N., GAO, Z. e PAPAHAJDOPOULOS-STERNBERG, B. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 6039-44, 2003.
- TOUIL, T., CIRIC, B., VENTURA, E., SHINDLER, K. S., GRAN, B. e ROSTAMI, A. Bowman-Birk inhibitor suppresses autoimmune inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 271, p. 191-202, 2008.
- VENTURA, M. M., MIZUTA, K. e IKEMOTO, H. Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution. A study by light scattering. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 53, p. 195–201, 1981.
- VENTURA, M. M. e XAVIER-FILHO, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*).I. Purification and partial characterization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 553–566, 1966.
- VYHLIDAL, C., LI, X. e SAFE, S. Estrogen regulation of transferrin gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 305-17, 2002.
- WALKER, J. M. B. *The Protein Protocols Handbook*. New York: Humana Press, 1996. 809 p.
- WAN, X. S., HAMILTON, T. C., WARE, J. H., DONAHUE, J. J. e KENNEDY, A. R. Growth inhibition and cytotoxicity induced by Bowman-Birk inhibitor concentrate in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 31, p. 8-17, 1998.
- WAN, X. S., WARE, J. H., ZHANG, L., NEWBERNE, P. M., EVANS, S. M., CLARK, L. C. e KENNEDY, A. R. Treatment with soybean-derived Bowman Birk inhibitor increases serum prostate-specific antigen concentration while suppressing growth of human prostate cancer xenografts in nude mice. **Prostate**, v. 41, p. 243-52, 1999.
- WANG, T., PETRENKO, V. A. e TORCHILIN, V. P. Paclitaxel-loaded polymeric micelles modified with MCF-7 cell-specific phage protein: enhanced binding to target cancer cells and increased cytotoxicity. **Molecular Pharmacology**, v. 7, p. 1007-14, 2010.
- WARE, J. H., WAN, X. S., NEWBERNE, P. e KENNEDY, A. R. Bowman-Birk inhibitor concentrate reduces colon inflammation in mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. **Digestive diseases and Sciences**, v. 44, p. 986-90, 1999.



WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2006. 850 p.

WHO (World Health Organization International Agency for Research on Cancer). World Cancer Report. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>, acessado em 12 de fevereiro de 2012.

XAVIER-FILHO, J. e VENTURA, M. M. Trypsin inhibitors in Cowpea: a review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 1, p. 239–314, 1988.

YAN, L., LI, D. e YEE, J. A. Dietary supplementation with isolated soy protein reduces metastasis of mammary carcinoma cells in mice. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 19, p. 535-40, 2002.

ZHANG, M., YANG, F., JR., YANG, F., CHEN, J., ZHENG, C. Y. e LIANG, Y. Cytotoxic aggregates of alpha-lactalbumin induced by unsaturated fatty acid induce apoptosis in tumor cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, p. 131-42, 2009.

ZHANG, Y. e CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 658-63, 2006.

ZHU, L., HUO, Z., WANG, L., TONG, X., XIAO, Y. e NI, K. Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, p. 136-143, 2009.

ZINCHUK, V., ZINCHUK, O. e OKADA, T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. **Acta Histochem Cytochem**, v. 40, p. 101-11, 2007.