

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Molecular

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O PROTEASSOMA E O  
INIBIDOR DE PROTEASE BTCI:  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITOS  
MOLECULARES EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
MAMA (MCF-7)**

Larissa da Costa Souza

Brasília  
2010



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Molecular

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O PROTEASSOMA E O  
INIBIDOR DE PROTEASE BTCI:  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITOS  
MOLECULARES EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
MAMA (MCF-7)**

Larissa da Costa Souza

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria de Freitas  
Coorientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá

Dissertação de Mestrado submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Molecular da Universidade de  
Brasília, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em  
Biologia Molecular.

Brasília  
2010

*Dedico este trabalho à minha família, a base de tudo na minha vida: minha mãe, meu pai, meu irmão e meu noivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria de Freitas, pela oportunidade de participar nesse projeto, por todos os anos de aprendizado e dedicação no laboratório de Biofísica Molecular – UnB, e por todo o apoio que me deu nos anos em que fui sua aluna.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Cezar Martins de Sá, por todo o apoio e dedicação nessa dissertação, pelos ensinamentos e atenção destinados a mim e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos meus amados pais, Adriano e Wayne, a base de tudo o que tenho, sem os quais não teria me tornado a pessoa que sou. Obrigada por todo o amor, compreensão e atenção. Devo todas as minhas conquistas a eles.

Ao meu querido noivo, Alexandre, e toda sua família, por toda dedicação, amor, compreensão e apoio destinados a mim. Por todos os momentos felizes juntos, que me ajudaram na realização dessa dissertação.

Ao meu irmão Thiago, pelo apoio e companheirismo durante toda a minha vida.

A todos meus familiares, os que estão próximos e os que estão longe, por todo amor e atenção que me dedicaram sempre.

A todos meus colegas do Laboratório de Biofísica Molecular – UnB, em especial à minha amiga de todas as horas, Muriele, e ao meu amigo companheiro em todos os momentos, Adelson. Ao Everton, Sandrielle, Alice, Gisele Esteves, Gisele Xavier, Mary-ann, Viviane, Graziella e Rozeni, que me ajudaram muito a realizar esse trabalho.

A todos meus colegas do Laboratório de Microbiologia – UnB, em especial aos meus queridos amigos Renata, Ricardo, Lillian e Patrícia. Obrigada por toda ajuda e pela ótima companhia.

A todos os professores do Instituto de Biologia, em especial ao Prof. Dr. Jaime Santana, pela atenção e ajuda na obtenção dos anticorpos utilizados nesse trabalho, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Bão, por permitir a utilização do Microscópio Confocal e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Dolabela por todos os ensinamentos e apoio.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilene Demasi, por ceder amostras de proteassoma 20S purificado, do Instituto Butantan. Obrigada por ter acreditado nesse trabalho.

A todos meus amigos, do colégio e da Universidade, por momentos maravilhosos e por todo o apoio e incentivo durante a realização dessa dissertação.

Aos funcionários Chiquinho e Marinez por todo o carinho e dedicação ao trabalho, o que foi essencial para a realização desta dissertação.

À querida Ana, da secretaria da Pós-Graduação, por todo apoio e atenção.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pela oportunidade de crescimento profissional e por todo o apoio.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de formação profissional.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, pela oportunidade de utilizar o equipamento de Espalhamento Dinâmico de Luz e a todos os funcionários desse laboratório, pelo enriquecimento e aprendizado.

À Capes, ao CNPq e à FAPDF pelo auxílio financeiro.

A todos que tornaram esse trabalho possível e que não ressaltei acima. Eu não teria conseguido nada sem a ajuda de todas as pessoas que fazem ou fizeram parte da minha vida. Obrigada!

## **RESUMO**

Dietas ricas em leguminosas têm sido associadas à baixa incidência de câncer em populações humanas, sendo essas plantas, ricas em inibidores de proteases. O BTCI (black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor) é um inibidor de protease da família Bowman-Birk, isolado de sementes da leguminosa *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda), que inibe a tripsina e a quimotripsina simultaneamente. Diversos estudos mostraram o efeito de um Inibidor Bowman-Birk (BBI) no controle de vários tipos de câncer. Recentemente, o BTCI foi caracterizado como um agente anticarcinogênico em estudos *in vitro* utilizando células de câncer de mama. Os resultados encontrados nesse estudo apontam para efeitos citotóxicos e citostáticos, no entanto, o mecanismo molecular envolvido nesses eventos ainda não foi elucidado. Considerando que o câncer está, de forma geral, relacionado a disfunções no ciclo celular, a via ubiquitina-proteassoma torna-se alvo promissor para o controle de células cancerosas. A investigação dos efeitos do BTCI no proteassoma é uma das principais metas que nortearam o presente trabalho. A caracterização físico-química e molecular da associação BTCI-proteassoma é fundamental para a compreensão da atividade do BTCI, relacionada ao controle do ciclo celular de células de câncer de mama, visando à possível aplicação desse inibidor como agente anticarcinogênico.

O BTCI apresentou inibição contra as três atividades proteolíticas do proteassoma 20S: quimotripsina, tripsina e caspase-*like*. Adicionalmente, peptídeos derivados do BTCI, com apenas um sítio de inibição, apresentaram inibição do proteassoma com menor afinidade, ou ativação de algumas atividades proteolíticas desse complexo macromolecular. O BTCI e o proteassoma 20S formaram complexos estáveis em temperaturas até 55°C e em pHs neutros e básicos, sendo esse complexo sensível ao NaCl. Estudos *in vitro* mostraram que o BTCI é colocalizado com o proteassoma em células de câncer de mama MCF-7 no citoplasma e no núcleo e não altera a ubiquitinação de proteínas nessas células. O peptídeo derivado de BTCI, Pep1, que inibe o sítio da quimotripsina, não afeta o conteúdo de proteínas ubiquitinadas nas células MCF-7, o que pode estar relacionado com a inibição de proteínas E3 ligase, envolvidas na ubiquitinação de proteínas celulares. Esses dados indicam que a via ubiquitina-proteassoma está relacionada aos efeitos anticarcinogênicos do inibidor BTCI em células de câncer de mama, MCF-7, o que justifica a ampliação dos estudos nessa linha de pesquisa, visando à aplicação biotecnológica desse inibidor na terapia contra o câncer de mama.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, inibidor Bowman-Birk, via ubiquitina-proteassoma, câncer de mama.

## **ABSTRACT**

Diets rich in leguminous, a rich source of protease inhibitors, have been associated with low incidence of cancer in humans. The BTCI (black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor) is a Bowman-Birk protease inhibitor isolated from *Vigna unguiculata* (black-eyed pea) seeds, which inhibits trypsin and chymotrypsin simultaneously. Several studies have shown the effect of a Bowman-Birk inhibitor (BBI) in various types of cancer. Recently, BTCI was characterized as an anticancer agent in studies *in vitro* using breast cancer cells. The results from this study show cytotoxic and cytostatic effects of BTCI, however, the molecular mechanism involved in these events has not yet been elucidated. Considering that cancer is, in general, related to dysfunction in the cell cycle, the ubiquitin-proteasome pathway becomes a promising target for cancer cells control. The investigation of the BTCI effects on proteasome is one of the main purposes of the present study. The physical-chemical and molecular characterization of the BTCI-proteasome association is essential for understanding the activity of BTCI, related to cell cycle control in breast cancer cells, in order to consider its pharmacological application as anticarcinogenic agent.

BTCI showed inhibition against all three proteolytic activities of 20S proteasome: chymotrypsin, trypsin and caspase-like. Additionally, peptides derived from BTCI, with only one inhibition site, showed proteasome inhibition with lower affinity or activation of some proteolytic activities of this macromolecular complex. The BTCI and the 20S proteasome formed stable complexes at temperatures up to 55°C and neutral and alkaline pHs, however, this complex is sensitive to NaCl. *In vitro* studies showed that BTCI colocalizes with the proteasome in breast cancer cells, MCF-7, at cytoplasm and nucleus, and does not alter the ubiquitination of proteins in these cells. The peptide derived from BTCI, Pep1, which inhibits the chymotrypsin site, does not affect the ubiquitinated proteins content in MCF-7 cells, which may be related to inhibition of E3 ligase protein, involved in the ubiquitination of cellular proteins. These data indicate that the ubiquitin-proteasome pathway is related to the anticarcinogenic effects of BTCI in breast cancer cells MCF-7, which justifies the further studies in the same research line, aimed the biotechnological application of this inhibitor in therapy against breast cancer.

**Keywords:** *Vigna unguiculata*, Bowman-Birk inhibitor, ubiquitin-proteasome pathway, breast cancer.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Considerações gerais.....</b>	<b>01</b>
<b>1.2 Câncer de mama.....</b>	<b>02</b>
1.2.1 Aspectos gerais.....	02
1.2.2 Ciclo celular.....	05
1.2.3 Via ubiquitina-proteassoma e o câncer de mama.....	07
<b>1.3 Proteassoma</b>	
1.3.1 Características gerais.....	10
1.3.2 Proteassoma 20S.....	10
1.3.3 Atividade catalítica do proteassoma 20S.....	13
1.3.4 Proteassoma 26S.....	14
1.3.5 Via ubiquitina-proteassoma.....	16
1.3.6 Inibidores de proteassoma.....	19
<b>1.4 Inibidores de protease.....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Aspectos gerais.....	21
1.4.2 Inibidores da família Bowman-Birk.....	22
1.4.3 Atividade inibitória dos BBIs.....	23
1.4.4 Aplicação e importância dos inibidores Bowman-Birk.....	24
1.4.5 Peptídeos derivados de inibidores de protease naturais.	26
1.4.6 Black- eyed pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor (BTCI).....	27
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>4. EQUIPAMENTOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5. MATERIAIS.....</b>	<b>36</b>



<b>5.1 Soluções para cultivo de células</b> .....	36
5.1.1 Solução de antibióticos.....	36
5.1.2 Meio DMEM.....	36
5.1.3 Verseno EDTA.....	36
5.1.4 Tripsina.....	36
5.1.5 Verseno-Tripsina.....	37
<b>5.2 Soluções para o ensaio de atividade</b> .....	37
5.2.1 Tampão de ensaio para proteassoma (Proteasome Assay Buffer).....	37
5.2.2 Solução de parada do proteassoma (Proteasome Assay Stop Solution).....	37
<b>5.3 Tampões utilizados para os ensaios de Dicroísmo Circular e Espalhamento Dinâmico de Luz</b> .....	37
<b>5.4 Soluções para Western Blotting</b> .....	38
5.4.1 Tampão PBS (1X).....	38
5.4.2 Solução Fixadora.....	38
5.4.3 Solução APB (Alcaline Phosphatase Buffer).....	38
5.4.4 Solução reveladora de fosfatase alcalina.....	38
<b>5.5 Soluções para eletroforese em géis de poliacrilamida</b> .....	38
5.5.1 Tampão de amostra SDS PAGE (1X) .....	38
5.5.2 Tampão de corrida SDS-PAGE (1X) .....	38
5.5.3 Gel separador SDS PAGE .....	39
5.5.4 Gel concentrador SDS PAGE .....	39
<b>6. METODOLOGIA</b> .....	40
<b>6.1 Purificação de BTCl</b> .....	40
6.1.1 Extrato bruto.....	40
6.1.2 Purificação do BTCl.....	41
<b>6.2 Obtenção de anticorpos anti-BTCl</b> .....	41
6.2.1 Imunização dos camundongos.....	41
6.2.2 Purificação dos anticorpos anti-BTCl.....	42
6.2.3 Confirmação da funcionalidade do anticorpo.....	43
<b>6.3 Cultura de células</b> .....	44
<b>6.4 Obtenção do proteassoma 20S e peptídeos derivados do BTCl</b> .....	44

<b>6.5 Atividade inibitória do BTC1 e peptídeos no proteassoma.....</b>	<b>45</b>
6.5.1 Ensaio de atividade .....	45
6.5.2 Cálculo da constante de inibição .....	46
<b>6.6 Espalhamento Dinâmico de Luz – EDL .....</b>	<b>46</b>
<b>6.7 Análise da estabilidade estrutural do proteassoma por Dicroísmo Circular (DC).....</b>	<b>48</b>
6.7.1 Análise da estrutura secundária.....	48
6.7.2 Desnaturação térmica.....	49
<b>6.8 Ensaios de citolocalização por Imunofluorescência.....</b>	<b>49</b>
<b>6.9 Efeito do BTC1 e peptídeos na ubiquitinação de proteínas celulares.....</b>	<b>50</b>
<b>6.10 Sobreposição estrutural do BTC1 e da ubiquitina.....</b>	<b>52</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>7.1 Purificação e análise da pureza do BTC1.....</b>	<b>53</b>
<b>7.2 Obtenção de anticorpos anti-BTC1.....</b>	<b>54</b>
<b>7.3 Obtenção do proteassoma 20S.....</b>	<b>56</b>
<b>7.4 Atividade inibitória do BTC1 e de peptídeos sintéticos.....</b>	<b>57</b>
7.4.1 Ensaio de atividade do BTC1.....	57
7.4.2. Cálculo da constante de inibição .....	58
7.4.3 Ensaio de atividade dos peptídeos derivados.....	59
<b>7.5 Interação entre o BTC1 e o proteassoma analisada por Espalhamento Dinâmico de Luz – EDL.....</b>	<b>62</b>
7.5.1 Parâmetros hidrodinâmicos do proteassoma 20S.....	62
7.5.2 Parâmetros hidrodinâmicos do BTC1.....	63
7.5.3 Formação do complexo BTC1 - proteassoma 20S.....	64
7.5.4 Cinética da formação do complexo.....	66
7.5.5 Estabilidade do complexo sob efeito da temperatura.....	67
7.5.6 Estabilidade do complexo sob o efeito do pH.....	68
7.5.7 Estabilidade do complexo sob efeito da força iônica.....	70
<b>7.6 Estrutura e estabilidade do proteassoma analisada por Dicroísmo Circular.....</b>	<b>73</b>
7.6.1 Análise da estrutura secundária do proteassoma 20S....	73
7.6.2 Desnaturação térmica .....	75

7.7 Imunocitocalização do BTCl e do proteassoma em células MCF-7 .....	80
7.8 Efeito do BTCl e peptídeos na ubiquitinação de proteínas.....	84
8. DISCUSSÃO.....	89
9. CONCLUSÕES.....	104
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

<b>Figura 1.</b> Incidência do câncer de mama no Brasil, de acordo com faixas etárias, nas mulheres (dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA, de 2007).....	03
<b>Figura 2.</b> Figura simplificada do ciclo celular.....	06
<b>Figura 3.</b> Estrutura do proteassoma 20S.....	12
<b>Figura 4.</b> Formas do proteassoma encontrado em eucariotos.....	15
<b>Figura 5.</b> Atividades do proteassoma.....	17
<b>Figura 6.</b> Marcação de substratos com ubiquitina para a degradação pelo proteassoma 26S.....	18
<b>Figura 7.</b> <i>Vigna unguiculata</i> , vulgarmente conhecida como feijão-de-corda, é uma espécie pertencente à família das leguminosas (Fabaceae), subfamília papilionoídea (Faboideae).....	28
<b>Figura 8.</b> Estrutura tridimensional do BTCl.....	29

### Resultados

<b>Figura 9.</b> Purificação do BTCl por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) a partir do extrato bruto obtido de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .....	53
<b>Figura 10.</b> Análise da pureza do BTCl em gel de poliacrilamida 13 %.....	54
<b>Figura 11.</b> Atividade dos anticorpos policlonais anti-BTCl avaliada por <i>Western Blotting</i> .....	55
<b>Figura 12.</b> Proteassoma 20S purificado de eritrócito de cavalo.....	56
<b>Figura 13.</b> Atividade inibitória do BTCl contra o proteassoma.....	57
<b>Figura 14.</b> Atividade enzimática do proteassoma 20S na presença do BTCl em concentrações variando de 0 a $30 \times 10^{-6}$ M.....	59
<b>Figura 15.</b> Ensaio de atividade dos peptídeos derivados do BTCl com o proteassoma.....	61

<b>Figura 16.</b> Intensidade de espalhamento de luz e diâmetro hidrodinâmico do proteassoma 20S.....	63
<b>Figura 17.</b> Intensidade de espalhamento de luz em relação ao diâmetro hidrodinâmico do BTCl em diversas concentrações.....	64
<b>Figura 18.</b> Formação do complexo BTCl - proteassoma 20S monitorada por ELD.....	65
<b>Figura 19.</b> Formação do complexo BTCl – proteassoma após 45 minutos de incubação das moléculas (vermelho).....	66
<b>Figura 20.</b> Termoestabilidade do complexo BTCl – proteassoma 20S.....	68
<b>Figura 21.</b> Estabilidade do BTCl, proteassoma 20S e complexo BTCl– proteassoma em diferentes pHs.....	70
<b>Figura 22.</b> Efeito do NaCl na estabilidade do complexo BTCl– proteassoma.....	72
<b>Figura 23.</b> Espectro dicróico do proteassoma 20S.....	74
<b>Figura 24.</b> Desnaturação térmica do proteassoma em diferentes pHs.....	76
<b>Figura 25.</b> Elipticidade molar do proteassoma 20S, em comprimentos de onda longe do UV, com variação do pH, à temperatura ambiente.....	77
<b>Figura 26.</b> Espectros dicróicos do proteassoma 20S em diferentes pHs, com aumento da temperatura de 25 a 95°C.....	80
<b>Figura 27.</b> Análise de imunofluorescência do BTCl e proteassoma por microscopia confocal.....	82
<b>Figura 28.</b> Quantificação da intensidade de fluorescência do BTCl ( <b>A</b> ) e do proteassoma ( <b>B</b> ), pelo programa ImageJ.....	83
<b>Figura 29.</b> Efeito do BTCl e peptídeos derivados na ubiquitinação de proteínas de células MCF7.....	86
<b>Figura 30.</b> Análise da sobreposição estrutural do BTCl com a Ubiquitina usando o servidor Top Match.....	88

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Equipamentos utilizados neste trabalho e os respectivos fabricantes.....	35
<b>Tabela 2.</b> Cálculo da porcentagem de estruturas secundárias do proteassoma 20S usando o programa CD Spectra Deconvolution, avaliadas no espectro de 190 - 260 nm.....	75
<b>Tabela 3.</b> Cálculo da porcentagem de estruturas secundárias do proteassoma 20S em diferentes pHs à temperatura ambiente (25°C), avaliadas pelo programa CD Spectra Deconvolution, nos espectros de 190 - 260 nm.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

APB	- Tampão para fosfatase alcalina ( <i>Alcaline Phosphatase Buffer</i> )
BBI	- Inibidor Bowman Birk ( <i>Bowman Birk Inhibitor</i> )
BCIP	- 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato ( <i>5-bromo 4-chloro 3-indolylphosphate</i> )
BTCI	- Inibidor de tripsina e quimotripsina de feijão de corda ( <i>Black-eyed pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor</i> )
DEAE	- Dietilaminoetil ( <i>Dimethyl aminoethyl</i> )
DMEM	- Meio Eagle modificado por Dulbecco's ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Médium</i> )
DMSO	- Dimetilsulfóxido ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
DTT	- Ditioneitol ( <i>Dithiothreitol</i> )
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetra-acético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
NBT	- Cloreto de tetrazolium nitro azul ( <i>Nitro Blue Tetrazolium Chloride</i> )
NP – 40	- Nonidet P-40
PBS	- Tampão salina fosfato ( <i>Phosphate buffer saline</i> )
PMSF	- Fluoreto de fenilmetanosulfonil ( <i>Phenylmethanesulphonylfluoride</i> )
Sarcosil	- N-lauroil-Sarcosino ( <i>N-lauroylsarcosine</i> )
SDS	- Dodecilsulfato de sódio ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
TCA	- Ácido tricloroacético ( <i>Trichloroacetic acid</i> )
TEMED	- N, N, N', N', - tetrametiletilenodiamida ( <i>N, N, N', N', - tetramethylethylenodiamine</i> )
TLCK	- N-p-tosil-L-lisil-clorometil-cetona ( <i>Tosyl-Lysyl-Chloromethyl-Ketone</i> )
TPCK	- N-p-tosil-L-fenilalanil-clorometil-cetona ( <i>Tosyl-Phenylalanyl-Chloromethyl-Ketone</i> )
Tris	- Tri (hidroximetil) aminometano ( <i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane</i> )

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Considerações gerais**

O BTCl (Black-eyed pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor) é um inibidor de serinoproteases, da família Bowman-Birk, extraído de sementes de *Vigna unguiculata*, popularmente conhecida como feijão-de-corda (Ventura *et al.*, 1966). Essa proteína inibe simultaneamente a quimotripsina e a tripsina, formando complexos estáveis (Ventura *et al.*, 1975). Os estudos com esse inibidor iniciaram-se há mais de trinta e cinco anos, com caracterizações físico-químicas, bioquímicas e biofísicas, desenvolvidos no laboratório de biofísica da UnB. Recentemente, a estrutura tridimensional cristalográfica desse inibidor foi resolvida e estudos de aplicações biotecnológicas estão em andamento.

Dietas ricas em leguminosas têm sido associadas à baixa incidência de câncer em populações humanas. Considerando que leguminosas são fontes ricas em inibidores de protease, essas moléculas podem ser as principais responsáveis pela ação protetora contra o câncer nas populações citadas (Kennedy, 1993b; Messina *et al.*, 1994; Messina e Barnes, 1991). Diversos estudos mostraram o efeito de um Inibidor Bowman-Birk (BBI) no controle do câncer (Kennedy, 1993b; Wan *et al.*, 1988; Kennedy, 1998; Dittmann *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2009) e, recentemente, esse efeito foi encontrado para o BTCl em células de câncer de mama (Joanitti *et al.*, 2010).

Considerando que o câncer está, de forma geral, relacionado a disfunções no ciclo celular e que o complexo proteolítico proteassoma é vital para esse controle, moléculas que interajam com o proteassoma podem estar associadas ao controle do câncer. O proteassoma apresenta 3 subunidades catalíticas com atividades caspase, quimotripsina e tripsina-*like* (Orlowski e Wilk, 2000; Groll e Huber, 2003). Os inibidores Bowman-Birk apresentam atividade inibitória contra essas proteases e, como inicialmente mostrado por Chen e colaboradores (2005), podem interagir com o complexo macromolecular proteassoma. A via de inibição do proteassoma pelos inibidores de proteases pode ser uma alternativa para o controle do ciclo



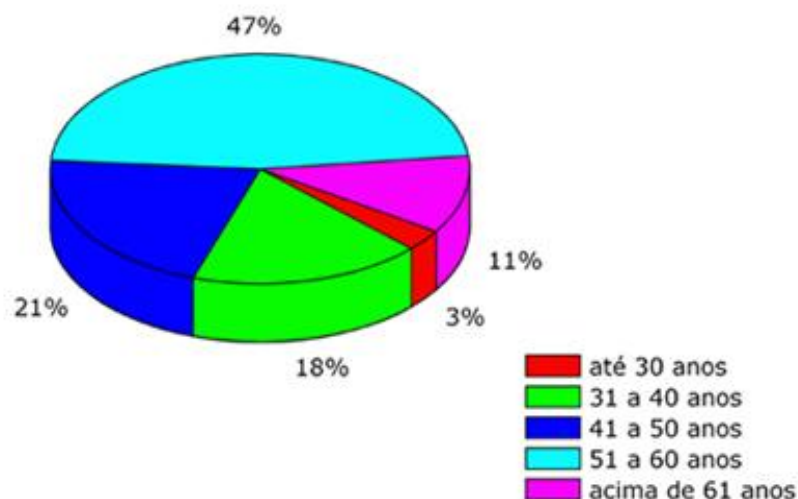
celular e/ou a morte de células cancerosas, o que torna inibidores de proteases alvos de estudo para o tratamento de diversos tipos de câncer e, entre eles, o câncer de mama. A seguir estão apresentados itens referentes às descrições de tópicos relevantes para o estudo proposto nessa dissertação, relacionados ao papel de inibidores Bowman-Birk, em particular o BTC1, no controle da atividade proteolítica do proteassoma de células de câncer de mama. Os resultados a serem apresentados nesse trabalho podem, como perspectivas futuras, direcionar estudos visando a compreensão do mecanismo envolvido no controle da proliferação e viabilidade das células de câncer de mama.

## **1.2 Câncer de mama**

### **1.2.1 Aspectos gerais**

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum entre mulheres de todo o mundo e a principal causa de câncer relacionada com mortalidade (Hortobagyi *et al.*, 2005). Mais de 1,2 milhões de casos são diagnosticados a cada ano, afetando 10 - 12% da população feminina, contabilizando 500.000 mortes por ano no mundo. Embora o câncer de mama seja predominante em países industrializados, as taxas desse câncer vêm crescendo também em países não-industrializados (Porter, 2008).

No Brasil, são esperados 49.400 novos casos em 2010, com risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Embora seja considerado um câncer de prognóstico eficaz, trata-se da maior causa de morte entre as mulheres brasileiras, principalmente na faixa entre 40 e 69 anos, com mais de 11 mil mortes/ano em 2007. Isso ocorre porque a incidência de câncer é bem maior nas faixas etárias acima de 41 anos (figura 1) e, na maioria dos casos, a doença é diagnosticada em estágios avançados (Inca, 2010).



**Figura 1.** Incidência do câncer de mama no Brasil, de acordo com faixas etárias, nas mulheres (dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA, de 2007). Disponível em <<http://www.mamainfo.org.br>>.

As taxas de mortalidade por câncer de mama caíram em muitas nações industrializadas, desde a década de 90, tendo, anteriormente, se mantido estável ou crescido por várias décadas consecutivas (Ravdin *et al.*, 2007; Beral *et al.*, 1995; Peto *et al.*, 2000). Essa diminuição da mortalidade tem sido atribuída principalmente à introdução da mamografia e do tratamento quimioterápico com tamoxifeno (Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno) (Berry *et al.*, 2005).

O câncer de mama é uma doença que ocorre principalmente no período pós-menopausa, com mais de 3/4 de tumores hormônio-responsivos. Essa dependência hormonal, juntamente com o ambiente e fatores genéticos, determina a incidência e progressão da doença (Hankinson *et al.*, 2004).

A idade e o sexo feminino são os principais fatores de risco do câncer de mama, com um aumento das taxas de incidência entre 35 e 39 anos, e posterior nivelamento a partir dos 80 anos (Anderson *et al.*, 2005). No entanto, a taxa de aumento é menor em torno da idade de 50 anos, correspondente à idade média de menopausa (Clemmesen, 1948). O câncer de mama em homens ainda é raro, somando menos de 1% dos casos de neoplasia mamária (D'Avanzo e La Vecchia, 1995).

O câncer de mama pode ter origem genética. Quando vários parentes de primeiro grau são afetados, a causa é provavelmente hereditária e atribuída à susceptibilidade a mutações em genes de alto risco, tais como *BRCA1* e *BRCA2* (Robson e Offit, 2007). Esses são genes supressores de tumor que apresentam um padrão de herança autossômica dominante. Mutações nesses genes são responsáveis por 3/4 dos casos de câncer de mama hereditários (5 - 10% de todos os casos desse câncer) (Ford e Easton, 1995).

A diferenciação física de nódulos benignos ou malignos da mama não é simples. Para uma avaliação clínica completa é necessária a integração de informações de exames clínicos, de imagens radiológicas e de uma biópsia percutânea. O diagnóstico de mamografia pode confirmar uma suspeita de malignidade, sendo que somente em 10% dos casos, essa malignidade não é mostrada por mamografia (Smith, 2007).

Apesar da alta incidência de câncer de mama entre mulheres, as melhorias nos tratamentos, juntamente com as técnicas de diagnóstico, estão ocasionando queda, mesmo que mínima, da mortalidade. O controle da doença aumenta a sobrevida; e uma maior atenção às questões cirúrgicas e o melhoramento de técnicas de radioterapia tem reduzido a reincidência do tumor em pacientes após cirurgia de conservação da mama (quando não ocorre mastectomia). Além disso, o perfil molecular da doença pode fornecer informações individuais preditivas sobre a manifestação da doença, o que permite orientar a aplicação clínica de terapias biológicas e racionalizar sua integração com tratamentos sistêmicos convencionais (Benson *et al.*, 2009).

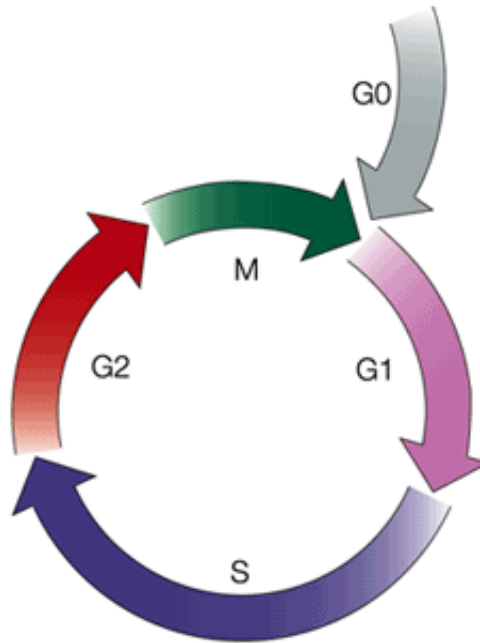
Avanços em terapias anti-câncer têm ocorrido a partir de uma combinação de agentes citotóxicos com vários alvos moleculares. A justificativa para o uso de diferentes alvos moleculares e uma combinação de terapias tem sido validadas por experimentos que visam novas drogas contra o câncer, utilizando-se agentes que afetam as vias de apoptose (Chen *et al.*, 2006), migração e invasão (Sierra, 2005), angiogênese (Broxterman e Georgopapadakou, 2005; Morabito *et al.*, 2006), transdução de sinal de células tumorais (Adjei, 2006), balanço entre síntese e degradação de proteínas (Richardson *et al.*, 2003; Nawrocki *et al.*, 2005; Demarchi e Brancolini, 2005; Horton *et al.*, 2006), e, de forma geral, o ciclo celular das células cancerosas.

## 1.2.2 Ciclo celular

A perda da regulação normal do ciclo e divisão celular são eventos importantes no desenvolvimento do câncer. Complexas redes de fatores regulatórios estão relacionadas ao desenvolvimento do tumor, tais como as resultantes de danos no DNA, de falhas no ciclo celular e do controle de sobrevivência e morte celular (Meeran e Katiyar, 2008).

Ao longo da evolução, células desenvolveram vários mecanismos de reparo para lidar com diferentes tipos de ataques ao DNA. Esses mecanismos envolvem tanto o reparo de quebras no DNA como a parada do ciclo celular ou, até mesmo, a morte celular programada, ou seja, apoptose. A célula é, portanto, capaz de interromper a progressão do ciclo para garantir que processos como a replicação do DNA e a mitose ocorram de forma completa (Hartwell e Weinert, 1989). A correta progressão do ciclo celular depende da capacidade da célula de traduzir sinais extracelulares, tais como estímulos mitogênicos e da matriz extracelular, a fim de assegurar que a replicação do DNA e a divisão celular ocorram eficientemente.

O ciclo celular em células eucarióticas é dividido em quatro fases: Intervalo fase 1 (G1), síntese de DNA (S); Intervalo fase 2 (G2), onde a célula se prepara para a própria divisão, e mitose (M), durante a qual os cromossomos se separam e a célula se divide (Norbury e Nurse, 1992). Além dessas fases, existe uma fase quiescente, G0, onde a célula não prossegue no ciclo celular, mas pode voltar ao mesmo após receber estímulos para a proliferação (figura 2) (Molinari, 2000).



**Figura 2.** Figura simplificada do ciclo celular. O ciclo celular apresenta 4 fases distintas: intervalo 1 (G1), síntese de DNA (S), intervalo 2 (G2) e finalmente a mitose (M). Células quiescentes que não estão ativas no ciclo celular se encontram em fase G0. Adaptado de Coleman *et al.*, 2004.

O rápido processo na mitose celular inclui o alinhamento cromossômico na metáfase, segregação dos cromossomos homólogos na anáfase e posterior divisão do material genético levando à interfase seguinte. A interfase é constituída de repouso e seguida por crescimento celular (fase G1) e posterior duplicação do material genético na fase S, sucedida de uma checagem na fase G2 antes que ocorra a mitose. A refinada regulação do ciclo de divisão celular é essencial para a duplicação de informação genética com altíssima fidelidade, e para a segregação correta destas informações durante a mitose (McDonald e El-Deiry, 2000).

A fim de garantir a adequada progressão do ciclo celular, as células passam por diversos pontos internos de checagem para verificar se as fases do ciclo estão ocorrendo de forma completa, antes de passar para a próxima etapa. Entre esses pontos, a mudança de fase do ciclo é estreitamente regulada por complexos de quinases dependentes de ciclinas (CDK), que são ativadas quando ligadas às proteínas reguladoras (ciclinas) (Hartwell e Kastan, 1994; Michalides, 1999; Pinto *et al.*, 2005).

CDKs são proteínas quinases que requerem ligação a subunidades de ciclinas para tornarem-se cataliticamente competentes. Diferentes membros da família CDK, em associação com ciclinas diferentes, representam ativações para vários pontos do ciclo celular. Complexos ciclina-CDK são regulados por fosforilação e por interações com outras proteínas regulatórias (Sherr e Roberts, 1999).

A progressão do ciclo celular é promovida pela oscilação na atividade de quinases dependentes de ciclina e pela proteólise da via ubiquitina-proteassoma, a qual regula a atividade de CDK, por degradação de ativadores e inibidores da CDK. Em mamíferos, três diferentes proteínas p21, p27 e p57 formam a família de inibidores de CDK (CKI) (Sherr e Roberts, 1999). Além disso, a proteólise do proteassoma é crucial durante a mitose por provocar a transição da metáfase para a anáfase (King, 1996).

### **1.2.3 Via ubiquitina-proteassoma e o câncer de mama**

Diversas proteínas bem estudadas na área clínica do câncer de mama, que atuam como oncogenes, genes supressores de tumor ou fatores de prognóstico são, em maioria, participantes da via de ubiquitinação (Ohta e Fukuda, 2004).

A via de proteólise ubiquitina-proteassoma regula uma série de processos celulares, onde reações rápidas e irreversíveis são necessárias. Entre eles está o controle do ciclo celular. Embora as quinases dependentes de ciclina (CDKs) sejam estáveis durante o ciclo celular, inibidores de CDKs (CKI), como famílias de ciclinas e de p21, são temporalmente expressos (Koepp *et al.*, 1999). Seus níveis relativos determinam onde as CDKs estão ativas ou inativas. Essa expressão temporal é mediada por degradação dependente da via ubiquitina-proteassoma. Ciclinas e CKIs, cujos níveis de expressão são alterados no câncer de mama, incluem a ciclina D1, a ciclina E1 e a p27. Elas são proteínas do ciclo celular que regulam a progressão do ciclo na transição da fase G1/S (Ohta e Fukuda, 2004). No nível de tradução, a ciclina D1 é superexpressada em 30-50% dos cânceres de mama humanos e está

relacionado a um oncogene nesse tipo de câncer (Musgrove *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; McIntosh *et al.*, 1995).

A transição G1/S também é regulada pela proteína E3 ubiquitina-ligase do tipo complexo SCF (Feldman *et al.*, 1997; Skowyra *et al.*, 1997). O SCF consiste em quatro subunidades: SKP1, CUL1, uma proteína F-box, e ROC1/Rbx1/Hrt1 (Zheng *et al.*, 2002). Proteínas F-box são subunidades receptoras que permitem a seletividade do substrato e interagem, na maioria dos casos, com substratos fosforilados. Várias proteínas F-box têm sido identificadas e cada uma interage com substratos específicos.

A primeira proteína F-box identificada, Skp2, liga a proteína p27 ao complexo SCF (Zhang *et al.*, 1995; Carrano *et al.*, 1999; Sutterlüty *et al.*, 1999). Skp2 especificamente reconhece a p27 em uma via dependente de fosforilação (Carrano *et al.*, 1999). Camundongos que não expressam a proteína Skp2 exibem acúmulo de p27 (Nakayama *et al.*, 2000). Skp2 é superexpressada em vários de tumores humanos, incluindo o câncer de mama, e a expressão de Skp2 é inversamente correlacionada com a de p27 (Gstaiger *et al.*, 2001; Signoretti *et al.*, 2002). A presença de Skp2 elimina os efeitos dos reagentes anti-estrógeno na proliferação normal de células epiteliais da mama humana (Signoretti *et al.*, 2002). Isso sugere que a não regulação da expressão de Skp2 pode resultar no desenvolvimento de um potencial oncogênico em células da mama (Ohta e Fukuda, 2004).

O gene *BRCA1*, de susceptibilidade ao câncer de mama e ovário, é provavelmente o gene mais estudado no campo do câncer de mama, devido a suas funções múltiplas e importância clínica. Esse gene apresenta mutação heterozigota em famílias predispostas ao câncer de mama e ovário (Mani e Gelmann, 2005). A proteína BRCA1 consiste em um domínio RING-*finger* amino-terminal, que inclui um sinal de localização nuclear e um domínio que se liga várias proteínas celulares (Miki *et al.*, 1994). BRCA1 tem sido relacionada com vários processos biológicos como o reparo de DNA, o controle do ciclo celular, a regulação da transcrição, a apoptose e a duplicação do centrôssomo. A função bioquímica conhecida para BRCA1 é a sua atividade E3 ubiquitina ligase (Ohta e Fukuda, 2004).

A proteína BRCA1 forma um heterodímero com outra proteína de domínio RING-*finger*, BARD1, para formar uma E3 ligase mais potente (Wu *et*

*al.*, 1996; Xia *et al.*, 2003). O complexo BRCA1/BARD1 catalisa a autoubiquitinação via polimerização na lisina-6 da molécula de ubiquitina, sítio de polimerização incomum que pode mediar a estabilidade da proteína ao invés de marcá-la para degradação (Nishikawa *et al.*, 2003; Wu-Baer, *et al.*, 2003). BRCA1/BARD1 liga-se à histona 2A/2AX como substrato, sugerindo que a estrutura da cromatina pode ser modificada pelo complexo (Chen *et al.*, 2002). Adicionalmente, o complexo BRCA1/BARD1 ubiquitina ele mesmo e aumenta sua atividade catalítica em cerca de 20 vezes (Mallery *et al.*, 2002).

Estrógenos apresentam ação tecido-específica, o que é de grande importância no desenvolvimento de tecidos de mama normais, bem como tecidos tumorais. A interação do estrógeno com seu receptor, um receptor de hormônio nuclear, induz a atividade transcricional do receptor. Aproximadamente metade dos cânceres de mama são positivos para receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) e, provavelmente, são estrógeno-dependentes. A via proteolítica ubiquitina-proteassoma é um dos mecanismos envolvidos na sinalização de ER. As células sob tratamento com estradiol apresentam ubiquitinação da ER  $\alpha$  aumentada (Nirmala e Thampan, 1995). Essa ubiquitinação é importante para degradação da ER por meio da via proteolítica dependente de proteassoma, e é também necessária para transativação eficiente da ER. Tratamento de células HeLa transfectadas com ER  $\alpha$ , com o inibidor de proteassoma MG 132, estabiliza os níveis de ER, mas prejudica a transcrição mediada por ER  $\alpha$  (Lonard *et al.*, 2000). Alguns antagonistas de receptores, incluindo tomoxifeno, o qual é um anti-estrógeno usado na terapia contra o câncer de mama, estimula a degradação dependente de proteassoma da ER  $\alpha$  (Pearce *et al.*, 2003; Preisler-Mashek *et al.*, 2002). É provável que o efeito anti-estrógeno de tais ligantes antagonistas seja, ao menos em parte, mediado pela modificação da degradação da ER  $\alpha$  dependente da via ubiquitina-proteassoma (Ohta e Fukuda, 2004).



## 1.3 Proteassoma

### 1.3.1 Características gerais

O proteassoma é um complexo protéico essencial de células eucarióticas e procarióticas que apresenta atividade proteásica multicatalítica, sendo o responsável pela degradação da maioria das proteínas celulares. Ele está presente tanto no citoplasma quanto no núcleo, podendo representar até 1% das proteínas celulares totais (Coux *et al.*, 1996). Em células de mamíferos, proteassomas são principalmente encontrados no citoplasma, mas também apresentam associação com elementos do citoesqueleto, núcleo e membrana plasmática. Entretanto, a taxa de associação do proteassoma com diferentes organelas varia nos diferentes tipos celulares (Wojcik e DeMartino, 2003).

A principal função desse complexo é catalisar a degradação de proteínas e pequenos peptídeos, desempenhando papel na degradação de proteínas anormais e proteínas regulatórias. O proteassoma está envolvido na regulação do ciclo celular (Ghislain *et al.*, 1993), apresentação de antígenos (Rock e Goldberg, 1993), processos oncogênicos (Scheffner *et al.*, 1992), regulação da transcrição e tradução (Palombella *et al.*, 1994), apoptose (Ellis *et al.*, 1991), reparo de DNA e remodelamento da cromatina (Demartino e Gillette, 2007).

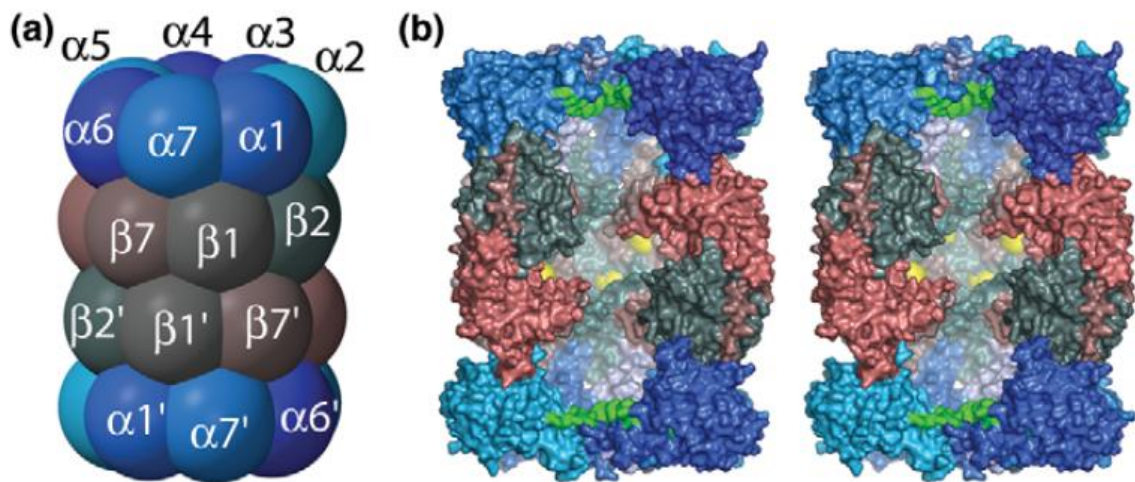
O proteassoma 26S é formado pela junção do núcleo catalítico (proteassoma 20S) a dois complexos regulatórios (19S). O proteassoma 20S apresenta massa molecular de 700 kDa e é altamente conservado, sendo encontrado em bactérias (Tamura *et al.*, 1995), arqueias (Rivett, 1993) e em todas as células eucarióticas.

### 1.3.2 Proteassoma 20S

O proteassoma 20S degrada inespecificamente, *in vitro*, proteínas desnaturadas ou peptídeos, independentemente de ATP (Lupas *et al.*, 1993). Os primeiros estudos da organização estrutural do proteassoma ocorreram após o isolamento do complexo 20S da arqueia *Thermoplasma acidophilum*

(Dahlmann *et al.*, 1989). Esses estudos revelaram que o proteassoma é composto por dois anéis externos formados, cada um, por sete subunidades do tipo  $\alpha$ , e dois anéis internos formados, cada um, por sete subunidades do tipo  $\beta$ , resultando no arranjo  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$  (Pühler *et al.*, 1992). O proteassoma eucarioto difere do proteassoma de *T. acidophilum*, por apresentar 7 tipos diferentes de subunidades  $\alpha$  e 7 tipos diferentes de subunidades  $\beta$ , formando um arranjo estrutural do tipo  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  (Baumeister *et al.*, 1998). O complexo 20S é composto por um canal central e três compartimentos, dois localizados entre os anéis  $\alpha$  e  $\beta$  e o terceiro localizado no centro do complexo, entre os anéis  $\beta$ , correspondendo ao sítio catalítico (Lupas *et al.*, 1993; Löwe *et al.*, 1995; Weissman *et al.*, 1995; Coux *et al.*, 1996). A estrutura tridimensional do proteassoma 20S de *T. acidophilum* foi elucidada por difração de raios-X (Löwe *et al.*, 1995).

Os anéis externos do complexo 20S apresentam as funções: interação com complexos regulatórios, controle do acesso de proteínas ao compartimento interno, participação na montagem do complexo e ativação das subunidades do tipo  $\beta$ . As subunidades do tipo  $\beta$  estão envolvidas na atividade proteolítica da partícula, onde, dentre as sete subunidades  $\beta$  que formam o anel, apenas 3 são ativas:  $\beta_1$  (Y),  $\beta_2$  (Z) e  $\beta_5$  (X) (Griffin *et al.*, 1998). A subunidade  $\beta_1$  é responsável pela atividade peptidil-glutamil hidrolase/caspase-like (PGPH), a  $\beta_2$  é responsável pela atividade tripsina-like e a  $\beta_5$ , pela atividade quimotripsina-like (Orlowski e Wilk, 2000; Groll e Huber, 2003) (figura 3).



**Figura 3.** Estrutura do proteassoma 20S. **(a)** Representação esquemática das subunidades do proteassoma. Os sítios ativos são formados no N-terminal das subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$ . Os substratos preferenciais para esses sítios são:  $\beta 1$  – substratos de PGPH,  $\beta 2$  – substratos de tripsina-*like* e  $\beta 5$  – substratos de quimotripsina-*like*. **(b)** Representação da superfície molecular do proteassoma mostrando as subunidades em cores distintas. Os sítios ativos (amarelo) são separados no canal catalítico central. Substratos e produtos passam através de uma abertura denominada  $\alpha$ -annulus (verde) no centro do anel formada pelas subunidades  $\alpha$ . Adaptado de Rechsteiner e Hill, 2005.

Além do proteassoma “constitutivo” descrito, também existe o imunoproteassoma, que é induzido por infecções microbianas e por citocinas imunomoduladoras, como o interferon (IFN)- $\gamma$ . Esta citocina induz a expressão de três subunidades proteassomais em mamíferos,  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 5i$  (LMP7) e  $\beta 2i$  (MECL-1), que são incorporadas no lugar das subunidades  $\beta$  (Y, X e Z, respectivamente) para formar imunoproteassomas. O imunoproteassoma contribui para a produção eficiente de epítomos para linfócitos T citotóxicos e participa no processamento de antígenos restrito à via de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe I e à imunidade mediada por células (Tanaka e Kasahara, 1998; Kloetzel, 2001; Rock *et al.*, 2002).

### 1.3.3 Atividade catalítica do proteassoma 20S

Todas as subunidades  $\beta$  do proteassoma são membros de uma família de proteínas que divergiram de um único ancestral, possivelmente similar à subunidade  $\beta$  de arqueia. Entretanto, apenas três subunidades,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  são proteoliticamente ativas nos eucariotos, apresentando uma treonina nucleofílica na região N-terminal. As outras subunidades  $\beta$  ( $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$  e  $\beta 7$ ) são inativas e incapazes de realizar autólise.  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  e  $\beta 6$  não apresentam a treonina nucleofílica na posição 1, e a subunidade  $\beta 7$  apresenta uma arginina 33 e uma fenilalanina 129 ao invés de uma lisina e uma serina, respectivamente (Groll *et al.*, 1999). As subunidades catalítica do proteassoma,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$ , são processadas de forma autocatalítica e independente (Schmidtke *et al.*, 1996).

A função das subunidades  $\beta$  não ativas pode estar relacionada com a formação dos centros ativos (Heinemeyer *et al.*, 1991; Heinemeyer *et al.*, 1993; Kopp *et al.*, 1997) e com a ligação e orientação das cadeias peptídicas dos substratos em fendas hidrofóbicas permitindo a clivagem das ligações peptídicas pelas subunidades vizinhas (Heinemeyer *et al.*, 1997). O resíduo de treonina atua, via o grupo hidroxila da cadeia lateral, como nucleófilo na hidrólise da ligação peptídica e é assistido por seu próprio grupo amino como acceptor de prótons. Adicionalmente, o resíduo de lisina 33 é o centro da catálise (Löwe *et al.*, 1995; Seemüller *et al.*, 1995), participando indiretamente da estabilização e orientação dos resíduos do sítio ativo, e diretamente, por meio do seu grupo  $\epsilon$ -amino atuando como acceptor de prótons para o grupo hidroxila da treonina 1. Ambos resíduos são necessários para clivagem peptídica externa (Seemüller *et al.*, 1995) e processamento autocatalítico das subunidades  $\beta$  (Seemüller *et al.*, 1996).

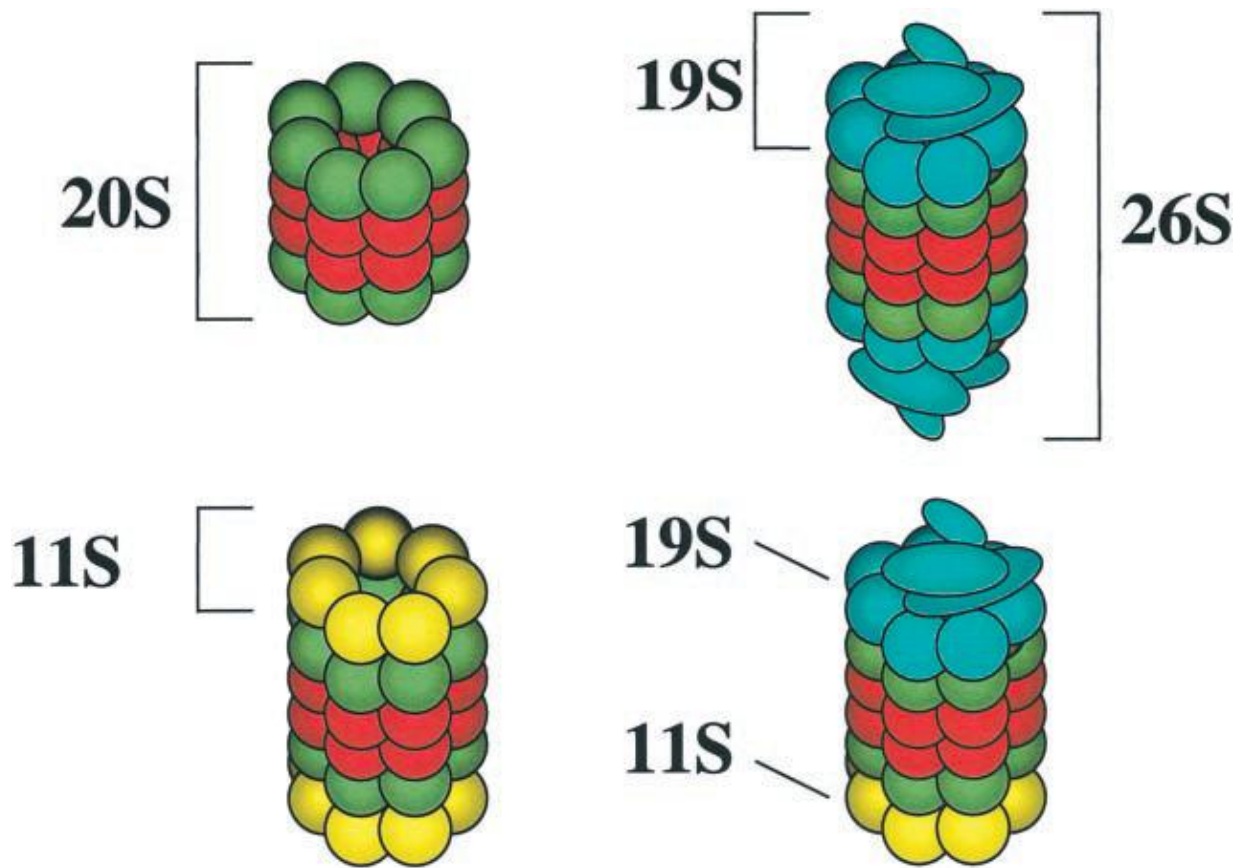
O proteassoma 20S humano pode clivar peptídeos na posição P1 (aminoácido imediatamente ao lado da ligação peptídica a ser clivada) para a maioria dos aminoácidos, com preferência por leucina e alanina. Além disso, aminoácidos próximos à posição P1, em posições P3 e P4, como a glutamina, valina, isoleucina, leucina e asparagina, influenciam a clivagem de peptídeos pelo proteassoma 20S (Harris *et al.*, 2001).

#### 1.3.4 Proteassoma 26S

Ao contrário do complexo 20S, o complexo 26S só foi encontrado em eucariotos. O 26S é um complexo multicatalítico, dependente de ATP, apresentando massa molecular de aproximadamente 2,0 MDa (Lupas *et al.*, 1993). Ele encontra-se principalmente no citoplasma, mas uma pequena fração foi detectada no núcleo (Yang *et al.*, 1995). Esse complexo apresenta papel principal na via de degradação proteolítica extra lisossomal, conhecida como via da ubiquitina, importante na degradação de diversas proteínas regulatórias.

O proteassoma 26S consiste no proteassoma 20S, o núcleo catalítico, ligado ao complexo regulatório 19S, conhecido como PA700. Proteassomas 20S degradam proteínas e peptídeos desdobrados ou mal enovelados, no entanto, ele não degrada proteínas ligadas à ubiquitina. O complexo PA700 se liga a uma ou ambas as extremidades proteassomais, na presença de ATP, para direcionar as proteínas ubiquitinadas para o centro de degradação do proteassoma 20S. O PA700 é um complexo composto por diversas subunidades, as quais conferem atividades de ATPase, ligação à ubiquitina, deubiquitinação, desenovelamento, entre outras (Glickman *et al.*, 1998; Voges *et al.*, 1999; Pickart e Cohen 2004).

Além de se ligar ao PA700, o proteassoma 20S pode se associar independente de ATP a outro ativador, o PA28, ou o regulador 11S, para formar complexos que aumentam a atividade proteassomal. Tanto o PA28 quanto o PA700 podem se ligar simultaneamente ao proteassoma 20S (figura 4) (Hendil *et al.*, 1998).



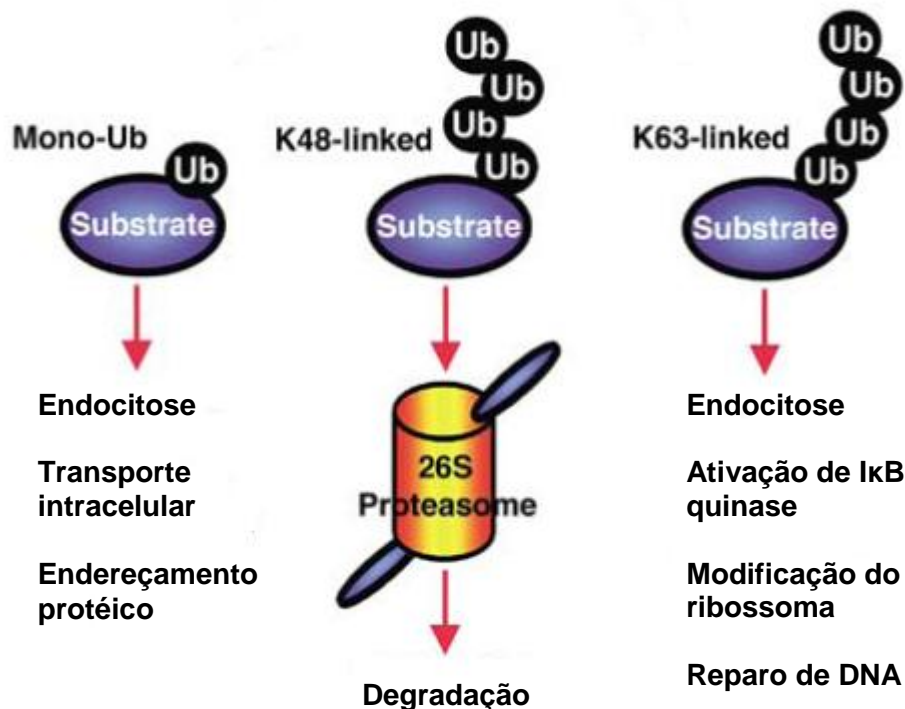
**Figura 4.** Formas do proteassoma encontrado em eucariotos. O complexo multicatalítico, ou 20S proteassoma, é composto por 4 anéis empilhados ao redor de um canal central. Cada um dos dois anéis mais externos contém sete subunidades diferentes, as quais, provavelmente estão relacionadas a funções estruturais e de regulação do complexo. Os dois anéis internos contêm sete subunidades diferenciadas e apresentam função catalítica. O proteassoma 20S quando combinado com os complexos regulatórios 11S ou 19S, chamados ativadores PA28 e PA700 respectivamente, apresenta atividade proteolítica alterada. Adaptado de Voorhees *et al.*, 2003.

A seletividade da ubiquitinação e a presença do complexo regulatório 19S, em eucariotos, certificam que a entrada do polipeptídeo seja altamente seletiva, evitando degradação inespecífica (Kloetzel, 2001). Além desse complexo regulatório, podem existir várias proteínas envolvidas na via ubiquitina-proteassoma, que se ligam à PA700 em quantidades sub-estequiométricas, regulando ainda mais esse processo (Schauber *et al.*, 1998).

### 1.3.5 Via ubiquitina-proteassoma

A ubiquitinação de proteínas está envolvida em diversos processos biológicos, como a transcrição, o ciclo celular, processamento de antígeno, defesa celular, sinalização celular, morte celular, entre outros (Ciechanover e Iwai, 2004; Varshavsky, 2005). Proteínas celulares marcadas para degradação de proteassomas 26S dependentes de ATP são ligadas à ubiquitina, uma proteína de 76 aminoácidos. Ela é ligada covalentemente à proteína alvo por uma ligação entre o carboxi-terminal da glicina da ubiquitina e, geralmente, o grupo  $\epsilon$ -amino da lisina da proteína alvo. Ligações isopeptídicas são formadas entre o carboxi-terminal da ubiquitina e o grupo  $\epsilon$ -amino de lisina de outra ubiquitina para formar cadeias poliubiquitinadas (Pickart, 2001; Weissman, 2001; Ciechanover e Iwai, 2004). Em algumas proteínas sem lisina a poliubiquitinação pode ocorrer na região amino-terminal (Ciechanover e Ben-Saadon 2004).

Além disso, diferentes lisinas marcadas podem representar diferentes sinais celulares. A poliubiquitinação nas lisinas 48 e lisinas 29 da ubiquitina representa o sinal de degradação mediada por proteassoma, enquanto a ubiquitinação de outros resíduos de lisina (lisina 63, por exemplo) representa sinais de reparo do DNA, ativação de fatores de transcrição, etc (Weissman, 2001). Por outro lado, a mono-ubiquitinação de proteínas apresenta outras funções, como a endocitose, regulação de histonas, brotamento viral, entre outras (Hicke, 2001) (figura 5).

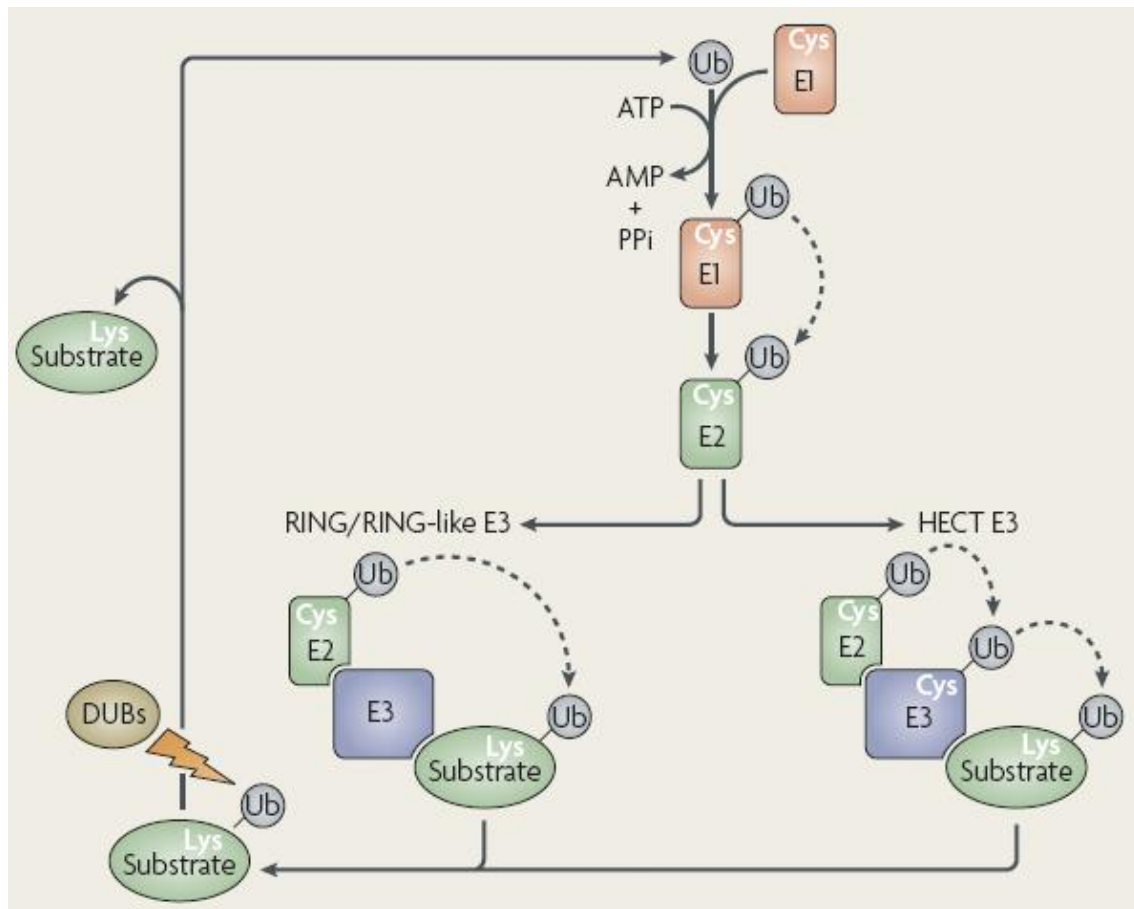


**Figura 5.** Atividades do proteassoma. Os substratos ubiquitinados são direcionados para degradação dependente de proteassoma ou para outras funções, dependendo do tipo de ubiquitinação. IκB: inibitor do NF-κB. Adaptado de Ohta e Fukuda, 2004.

O processo de marcação de substratos com ubiquitina para a degradação pelo proteassoma 26S pode ser resumido da seguinte forma: a ubiquitina é ativada pela ligação com uma enzima ativadora E1, por meio de uma ligação tioéster entre um resíduo de cisteína da E1 ativa e o carboxi-terminal da glicina da ubiquitina. A ubiquitina é transferida do complexo E1-ubiquitina para uma enzima conjugadora E2, formando uma ligação tioéster entre um resíduo de cisteína do sítio ativo da E2 e o carboxi-terminal da glicina da ubiquitina. Por fim, a ubiquitina é covalentemente ligada à proteína alvo por meio de uma ligação isopeptídica entre o carboxi-terminal da glicina da ubiquitina e um grupo ε-amino de um resíduo interno de lisina da proteína alvo. Essa reação é catalisada por uma proteína E3 ligase (figura 6). Depois da ligação de uma ubiquitina à proteína alvo, a cadeia de poliubiquitinas é formada pela ligação do carboxi-terminal de cada ubiquitina a um resíduo de lisina



específico (mais comumente a lisina 48) da ubiquitina seguinte (Ciechanover, 1998).



**Figura 6.** Marcação de substratos com ubiquitina para a degradação pelo proteassoma 26S. Substratos protéicos a serem eliminados são ligados às ubiquitinas (Ub) e reconhecidos pelo proteassoma 26S. A ubiquitina é ativada por E1 (dependente de ATP). A ubiquitina ativada é transferida a uma cisteína (Cys) ativa de uma segunda proteína, enzima conjugadora de ubiquitina, E2. Com a adição de E3 ligase, a E2 catalisa a transferência de uma (poli)ubiquitina na proteína destinada à degradação. A ubiquitinação é revertida por enzimas de deubiquitinação (DUBs), as quais removem a ubiquitina de proteínas e separam cadeias de poliubiquitinação. Adaptado de Ravid e Hochstrasser, 2008.

Embora o proteassoma 26S reconheça cadeias poliubiquitinas como principal marcação, várias E3 ligases reconhecem diversos substratos com sinais para degradação, contribuindo para a seletividade e especificidade do sistema ubiquitina-proteassoma (Ciechanover e Iwai, 2004; Pickart, 2001; Pickart e Cohen, 2004; Voges *et al.*, 1999; Weissman, 2001). Análises

comparativas do genoma humano revelam alguns genes codantes para enzimas E1, dezenas de genes que codificam enzimas E2 e centenas de codificações para E3 ligases (Semple *et al.*, 2003). A via ubiquitina-proteassoma regula e elimina proteínas específicas, deixando outras intactas, por meio da E2 e da especificidade mediada por E3, permitindo uma regulação celular refinada (Varshavsky, 2005).

A ubiquitina precisa ser removida das proteínas alvo antes de entrar no núcleo proteolítico dos proteassomas. As enzimas clássicas de deubiquitinação pertencem às famílias de processamento de ubiquitina (UBP) e ubiquitina carboxi-terminal hidrolases (UBH). Em geral, as UBPs removem a ubiquitina de cadeias poliubiquitinadas, enquanto as UBHs removem pequenos conjugados de ubiquitina e regeneram monômeros de ubiquitina livres (Kim *et al.*, 2003; Weissman 2001).

Estudos recentes vêm demonstrando que a inibição da via de ubiquitina-proteassoma, tanto pela via da E3 ligase quanto do próprio proteassoma, está relacionada com efeitos anticarcinogênicos importantes. A E3 ligase é um importante alvo terapêutico, visto que ela apresenta funções especializadas e está relacionada a diversos processos celulares, como progressão do ciclo celular, oncogênese, transdução de sinal, regulação da transcrição, reparo de DNA, endocitose, transporte e desenvolvimento (Sun, 2003). Cada E3 é específica para um pequeno conjunto de proteínas, portanto, inibidores de E3 ligases podem inibir a ubiquitinação e a degradação mediada por proteassoma 26S em processos celulares específicos (Vassilev *et al.*, 2004).

### **1.3.6 Inibidores de proteassoma**

Estudos de inibição do proteassoma têm sido fundamentais nas pesquisas de câncer e de resistência a drogas. A maioria dos processos de proteólise regulada nas células eucarióticas ocorre pela via ubiquitina-proteassoma (Ciechanover, 2005). A inibição do proteassoma tem sido bem estabelecida como uma estratégia racional para mieloma múltiplo (Richardson *et al.*, 2006), linfoma não-Hodgkin (Goy *et al.*, 2005) e alguns outros tumores (Dou e Goldfarb, 2002).

Os primeiros tipos de inibidores de proteassoma descobertos foram os peptídeos aldeídos, como o N-acetil-Leu-Leu-Norleucinal, chamado de inibidor de calpaína I. Este composto inibe reversivelmente o proteassoma 20S modificando o grupo hidroxila da treonina catalítica, formando uma ligação hemiacetal. Ele pode rapidamente se dissociar dos proteassomas e é rapidamente oxidado em ácidos inativos. O inibidor de calpaína I inibe principalmente a atividade quimotripsina-*like* dos proteassomas e reduz significativamente a taxa de degradação de proteínas citosólicas (Rock *et al.*, 1994).

Vários inibidores sintéticos têm sido descritos como inibidores proteassomais, dentre elas peptídeos aldeídos como: MG132 (Cbz-Leu-Leu-leucinal), MG115 (Cbz-Leu-Leu-norvalil), ALLN (Acetil-Leu-Leu-norleucinal) (Lee e Goldberg, 1998). A epoximicina é o inibidor de proteassoma mais seletivo, uma vez que não inibe outras enzimas celulares. Epoximicina reage com o N-terminal da treonina catalítica do proteassoma para formar um derivado morpholino irreversível (Groll *et al.*, 2000) e apresenta atividades anti-tumoral e antiinflamatória *in vivo* (Meng *et al.*, 1999). A lactacistina é um inibidor específico para proteassomas. Essa molécula é um metabólico de *Streptomyces*, que inibe a progressão do ciclo celular e induz a diferenciação de neuroblastomas de camundongos (Fenteany *et al.*, 1994).

Diversas proteínas celulares e virais foram identificadas e caracterizadas como inibidoras da atividade de proteólise do proteassoma 20S *in vitro*. PI31 (Proteasome Inhibitor of 31 kDa) é uma proteína intracelular, rica em aminoácidos prolina, que inibe *in vitro* a degradação de proteínas desoveladas e peptídeos fluorogênicos (McCutchen-Maloney *et al.*, 2000). PR39 é uma proteína de 39 resíduos de aminoácidos de prolina e argininas, capaz de atravessar rapidamente as membranas celulares, originalmente isolada de macrófagos que secretavam peptídeos antibacterianos (Gallo, *et al.*, 1994). Estudos *in vitro* mostram que a PR39 é um inibidor reversível e não competitivo do proteassoma 20S e 26S (Gaczynska *et al.*, 2003). Tat é uma proteína de HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) de 86 resíduos de aminoácido, que atua como ativador transcricional. Tat interage com as subunidades proteassomais do complexo 26S, afetando essa atividade proteolítica *in vitro* (Seeger *et al.*, 1997).

Em estudos pré-clínicos utilizando modelos animais, alguns inibidores de proteassoma promoveram a morte celular de diversos tumores *in vitro* e *in vivo* (Adams, 2003). O bortezomibe é o primeiro inibidor sintético específico para via proteassomal a ser utilizado na fase clínica de diversos tumores. Ele bloqueia a atividade de quimotripsina do proteassoma de forma reversível (Rajkumar *et al.*, 2005). Esse inibidor já foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para tratamento de mieloma múltiplo e linfoma não-Hodgkin (NHL) e vem sendo utilizado clinicamente em 85 países desde então (Adams, 2004). Inibidores de proteassoma podem ser alternativas promissoras no tratamento de vários tumores humanos (Lee e Goldberg, 1998), visto que muitas células transformadas são significativamente mais sensíveis à inibição do proteassoma, quando comparadas com células normais (An *et al.*, 1998; Delic *et al.*, 1998; Soligo *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003).

Vários inibidores de proteassoma vêm sendo testados para o tratamento do câncer. Um novo grupo de inibidores que apresentam inibição do proteassoma e atividade anticarcinogênica são os inibidores de serinoproteases, como o BBI (*Bowman Birk Inhibitor*). O BBI é um inibidor de quimotripsina e tripsina, encontrado em sementes de soja, e inibe parcialmente a atividade do proteassoma 26S, principalmente a atividade quimotripsina-*like* (Chen *et al.*, 2005). Até o momento, esse é o único trabalho que relata a relação de inibidores do tipo Bowman-Birk com a atividade proteolítica de proteassomas.

## **1.4 Inibidores de protease**

### **1.4.1 Aspectos gerais**

Proteases estão envolvidas na hidrólise de proteínas intracelulares, na transcrição, no ciclo celular, na invasão celular e apoptose (Kato, 1999). Em sistemas biológicos, essas proteínas podem ser inativadas tanto por degradação proteolítica quanto por ação de inibidores, que agem como pseudo-substratos exibindo variáveis graus de afinidade com o sítio catalítico

das enzimas. Os inibidores de protease têm, portanto, importante papel na regulação das atividades proteolíticas de enzimas (Laskowski e Kato, 1980; Ikenaka e Norioka, 1986).

Os inibidores de protease são divididos em famílias de acordo com a classe de proteases inibidas, sequência primária e homologia estrutural entre os membros; além da localização das ligações dissulfeto e do sítio reativo (Laskowsky e Kato, 1980). Inibidores de proteases de plantas pertencem a famílias de proteínas que são usadas para a defesa da planta contra insetos e microorganismos, a partir da inibição de suas enzimas proteolíticas específicas (Richardson, 1977). Os inibidores bloqueiam a região da sede catalítica da enzima interagindo, nesta região, por forças não covalentes com uma alça que interliga duas fitas  $\beta$ , denominada sítio reativo (Farady *et al.*, 2007).

Inibidores de protease de plantas têm sido descritos como proteínas de armazenamento (McGrain *et al.*, 1989), e proteção das plantas contra infecções e em processos defensivos (Franco *et al.*, 2003). Plantas transgênicas podem expressar essas proteínas e a alteração no padrão protéico pode conferir maior proteção contra pestes (Franco *et al.*, 2003; Hilder e Boulter, 1999; Schuler *et al.*, 1998).

#### **1.4.2 Inibidores da família Bowman-Birk**

Inibidores de serinoproteases são amplamente distribuídos na natureza e podem inibir a ação de enzimas em diferentes organismos. Esses inibidores variam quanto a sua especificidade e eles podem ser sintéticos ou naturais. Inibidores de protease naturais são classificados em 20 famílias diferentes (De Leo *et al.*, 2002; Laskowski e Qasim, 2000), entre eles os mais bem estudados são os inibidores da família Kunitz (Ascenzi *et al.*, 2003) e Bowman-Birk.

A família de inibidores Bowman-Birk (BBI) tem sido bastante estudada no nível estrutural e de atuação fisiológica (Losso, 2008). O BBI foi primeiramente identificado por Bowman em 1940 e purificado por Birk em 1961 (Birk, 1985). BBIs são inibidores ricos em cisteínas com massa molecular entre 6 e 20 kDa (Richardson, 1981). Eles apresentam 2 sítios reativos: a alça 1, no subdomínio N-terminal e a alça 2, no subdomínio C-terminal. Essas alças

permitem reatividade bifuncional contra tripsina e quimotripsina, respectivamente (Freitas *et al.*, 1999; Laskowski e Kato, 1980; Xavier-Filho e Ventura, 1988).

### 1.4.3 Atividade inibitória dos BBIs

As estruturas tridimensionais dos inibidores da família Bowman-Birk são similares e apresentam a mesma conformação dos sítios reativos, consistindo de dois subdomínios de ligação distintos compostos por um grampo  $\beta$  em duas fitas  $\beta$  antiparalelas estabilizadas por ligações dissulfeto. A superfície das alças reativas se estende pelo solvente, permitindo acesso facilitado para reconhecimento do sítio ativo das enzimas (Park *et al.*, 2004). As alças são geralmente bastante rígidas, reduzindo o decréscimo desfavorável na entropia, que ocorre na formação do complexo (Bode e Huber, 2000; Bode e Huber, 1992).

A característica estrutural mais atípica dos BBIs é a região hidrofóbica exposta (Freitas *et al.*, 1997; Koepke *et al.*, 2000; Voss *et al.*, 1996). Estudos estruturais mostram que essa região hidrofóbica favorece a internalização de resíduos carregados, formando um sítio eletricamente carregado na fronteira entre domínios e as moléculas internas de água (Voss *et al.*, 1996). As ligações polares e a conformação rígida do subdomínio 1 na região de ligação são características da especificidade contra a tripsina, enquanto o aumento da hidrofobicidade e uma significativa mobilidade estrutural são características do subdomínio 2, de ligação à quimotripsina. As regiões hidrofóbica expostas do subdomínio 2 são provavelmente as responsáveis pela auto-associação do inibidor (Voss *et al.*, 1996; Catalano *et al.*, 2003; Koepke *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2005).

De forma geral, o mecanismo de inibição dos inibidores Bowman-Birk é o mesmo de outros inibidores de serinoproteases. O complexo estável inibidor-enzima é rapidamente formado e apresenta taxa de dissociação bastante lenta. O inibidor é especificamente clivado na ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos P1-P1' (Ardelt e Laskowski, 1983; Ardel e Laskowski, 1985). As ligações dissulfeto dos inibidores Bowman-Birk contribuem para a rigidez da

estrutura molecular do inibidor, mantendo sua conformação ativa, e para a estabilidade do complexo formado entre inibidor e enzima (Ikenaka *et al.*, 1986; Park *et al.*, 2004). Neste complexo, a alça reativa do inibidor associa-se com os resíduos catalíticos, principalmente o resíduo de serina, de forma similar ao que acontece na interação entre o substrato e a enzima (Bode e Huber, 1992).

A alça reativa exposta (hidrofílica, na inibição da tripsina, ou hidrofóbica, na inibição da quimotripsina), quando interage com o sítio ativo da enzima é estabilizada por várias ligações de hidrogênio entre resíduos no sítio ativo e da alça do inibidor (Bode e Huber, 1992). Essa proximidade permite a fixação do grupo carbonila do resíduo P1 do inibidor com a serina catalítica da enzima (Huber *et al.*, 1974; Marquart *et al.*, 1983).

#### **1.4.4 Aplicação e importância dos inibidores Bowman-Birk**

Os inibidores Bowman-Birk são encontrados em mono e dicotiledôneas, principalmente em sementes de leguminosas (Mello *et al.*, 2003). Eles apresentam potencial para serem aplicados em obtenção de plantas geneticamente modificadas e em aplicações biomédicas, considerando sua ação contra microorganismos e insetos (Franco *et al.*, 2003; Ryan, 1973; Ryan, 1991; Xavier-Filho, 1992) e suas propriedades anticarcinogênicas (Dittmann *et al.*, 1995; Joanitti *et al.*, 2010; Kennedy *et al.*, 1993c; Kennedy, 1998; Troll *et al.*, 1987). Os inibidores de protease estão relacionados com a ação antinutricional, principalmente em insetos, ao inibir as proteases do seu intestino, apresentando função de proteção contra herbivoria (Franco *et al.*, 2003; Haq *et al.*, 2004; Xavier-Filho, 1992). Além disso, eles inibem uma variedade de atividades em nematóides patogênicos, e impedem o crescimento de vários fungos patogênicos, inibindo o crescimento do micélio e a germinação do esporo (Joshi *et al.*, 1998).

BBIs são reconhecidos como potentes supressores carcinogênicos *in vivo* (animais) e *in vitro* e não apresentam reações adversas ou toxicidade para o pâncreas e para o crescimento animal com doses duas vezes maiores que as utilizadas em seres humanos (Kennedy, 1998). Eles inibem a transformação maligna induzida tanto por agentes químicos quanto radioativos *in vitro*

(Kennedy, 1993a e 1998). O inibidor de protease Bowman-Birk (BBI) estimula o reparo do DNA após irradiação em fibroblastos (Dittmann *et al.*, 1998). Essa proteção é seletiva visto que o BBI só protege tecidos normais, não agindo sobre tecidos tumorais (Dittmann *et al.*, 2005).

Estudos mostram que tecidos humanos pré-malignos apresentam elevados níveis de atividade proteolítica. Serinoproteases em atividade desregulada podem estar associadas à invasão celular, metástase, angiogênese e crescimento do tumor (Darmoul *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2000). Inibidores de proteases podem inibir essa atividade e isso pode ser uma explicação para a ação preventiva desses inibidores (Billings *et al.*, 1987; Kennedy, 1998; Manzone, *et al.*, 1995). Trabalhos de Yavelow *et al.*, 1985, mostraram que a atividade anticarcinogênica do BBI está associada com a região da molécula que inibe a quimotripsina. Nesse caso, o BBI com sítio de reatividade contra tripsina modificado, ou seja, apresentado somente atividade inibitória contra quimotripsina, é responsável por todo efeito de supressão da carcinogênese em transformação *in vitro* induzida por raios-X. Além disso, a atividade anticarcinogênica do BBI está relacionada à habilidade de afetar a expressão de certos oncogenes e de interferir nos níveis de algumas atividades proteolíticas (Kennedy, 1995).

A atividade anticarcinogênica desses inibidores encontrados em leguminosas é evidenciada, em populações humanas, pela forte correlação entre altos níveis de consumo de leguminosas e baixa incidência de câncer de cólon, mama e próstata (Fontham e Correa, 1993). Um extrato de soja enriquecido em BBI, denominado concentrado de BBI (BBIC), está sendo testado como nova droga pela *US Food and Drug Administration* e está na fase clínica 2 para ser utilizado na prevenção do câncer (Kennedy, 1998; Armstrong *et al.*, 2000; Meyskens, 2001; Malkowicz *et al.*, 2001).

Além de efeitos anticarcinogênicos, o BBI apresenta efeitos antiinflamatórios (Maki e Kennedy, 1992). Touil e colaboradores (2008) demonstraram que a administração de BBIC suprime a encefalomielite autoimune experimental - EAE (modelo animal da Esclerose Múltipla) em ratos Lewis. Além disso, o BBI purificado resultou em melhoras significativas da doença nos níveis fase inicial, gravidade, perda de peso dos animais, inflamação e desmielinização, além de induzir a produção de Interleucina 10



(imunossupressor) por células imunes. De forma geral, o BBI reduz a inflamação e atenua a perda neuronal, mostrando que esse inibidor é o componente ativo do BBIC e um importante candidato para a terapia oral de esclerose múltipla.

#### **1.4.5 Peptídeos derivados de inibidores de protease naturais**

Diversas drogas comercializadas são derivadas de compostos naturais extraídos diretamente de plantas em seu habitat natural ou em cultivos. Entretanto, muitas espécies vegetais têm sido ameaçadas de extinção devido a extrações excessivas de compostos naturais (Rates, 2001), o que pode comprometer a diversidade da flora brasileira.

Além do risco de extinção, os processos de extração desses compostos são, muitas vezes, demorados e difíceis, o que encarece o preço do medicamento, diminuindo sua acessibilidade à população (Hamburger *et al.*, 1991). Por essa razão, novas drogas sintetizadas quimicamente, tendo como molde moléculas naturais, tem sido alvo de investigação, considerando que podem ser obtidas mais rapidamente, com maior controle de qualidade e menores custos financeiros (Hamburger *et al.*, 1991; Latham, 1999; Mann, 2002; Rates, 2001).

Considerando a importância e aplicação dos inibidores de protease da família Bowman-Birk listadas anteriormente, os peptídeos derivados desses inibidores são alvos de estudos que visam definir sua atividade e potencial biotecnológico (Wenzel e Tschesche, 1995; Vita *et al.*, 1997; Clemente e Domoney, 2006). Peptídeos derivados de inibidores Bowman-Birk têm apresentado atividade inibitória significativa e características estruturais similares às suas proteínas-molde (Li *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2001; Brauer *et al.*, 2001). A atividade desses peptídeos é dependente da estruturação cíclica da molécula, obtida pela formação da ligação dissulfeto. Peptídeos sem essa estrutura apresentam atividade baixa ou nula (Domingo *et al.*, 1995). A susceptibilidade do peptídeo à clivagem pela protease não está correlacionada com o potencial inibitório da molécula, mas sim com sua sequência de

aminoácidos (McBride *et al.*, 1998; Gariani e Leatherbarrow, 1997; Gariani *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 1999).

As características observadas desses peptídeos sintetizados com moldes de inibidores naturais permitem a construção de inibidores potentes e mais facilmente sintetizados (McBride *et al.*, 2002). Estudos realizados por Lockett e colaboradores (1999) relataram um novo peptídeo cíclico, com 14 resíduos de aminoácidos, encontrado naturalmente em girassóis, com atividade inibitória contra tripsina (SFTI-1, Sunflower trypsin inhibitor 1). Esses dados confirmam a importância biológica de peptídeos cíclicos com atividade inibitória (McBride *et al.*, 2002), mostrando que peptídeos com estrutura semelhante ao sítio reativo de inibidores Bowman-Birk podem ser relevantes no desenho de novas drogas, baseando-se nas propriedades que esses inibidores apresentam para aplicação biotecnológica no agronegócio e em tratamentos médicos, como descrito acima.

#### **1.4.6 Black-eyed pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor (BTCI)**

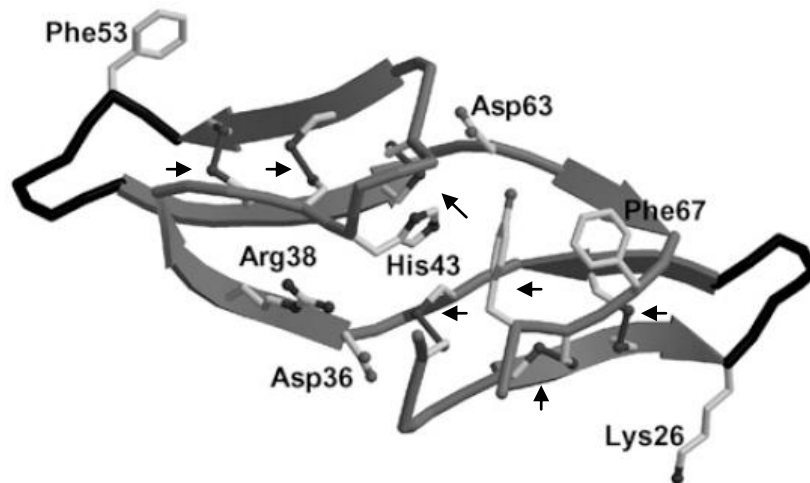
O BTCI (black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor) é um inibidor pertencente à família Bowman-Birk, isolado de sementes de *Vigna unguiculata* (figura 7), que apresenta dois sítios reativos diferentes e independentes para tripsina e quimotripsina, respectivamente (Ventura *et al.*, 1966; Xavier-Filho e Ventura, 1988). O sítio Lys26-Ser27 inibe a tripsina e o sítio Phe53-Ser54, a quimotripsina (Barbosa *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 1997).



**Figura 7.** *Vigna unguiculata*, vulgarmente conhecida como feijão-de-corda, é uma espécie pertencente à família das leguminosas (Fabaceae), subfamília papilionoídea (Faboideae). Disponível em <<http://www.fao.org/ag/AGP/agpc/doc/Show/SAfrica/sapaper/photo42.htm>>

A ligação do BTCl à tripsina e quimotripsina foi caracterizada como um processo endotérmico, espontâneo e entrópico (Fachetti *et al.*, 1984; Freitas *et al.*, 1999), formando complexos binário e ternário estáveis (Ventura *et al.*, 1975). O complexo binário BTCl e quimotripsina é rapidamente formado e dissocia-se muito lentamente em enzimas livres e uma mistura de inibidores não-modificados e modificados pela enzima (Freitas *et al.*, 1997). O complexo BTCl e tripsina é estabilizado por contatos hidrofóbicos e ligações de hidrogênio, e é estruturalmente independente da alça reativa contra quimotripsina (Barbosa *et al.*, 2007; Esteves *et al.*, 2007, Esteves, 2010).

Esse inibidor é uma proteína globular estável com 83 resíduos de aminoácido e sete ligações dissulfeto (figura 8) (Morhy e Ventura, 1987; Barbosa *et al.*, 2007). Além disso, o BTCl apresenta alta termo-estabilidade e estabilidade estrutural em ampla faixa de pH. O BTCl retém 96% de sua atividade inibitória depois de 60 minutos de aquecimento à 95°C e sua atividade é estável entre pH 3 e pH 10 (Silva *et al.*, 2001).



**Figura 8.** Estrutura tridimensional do BTCI. Diagrama de fita da estrutura do BTCI mostrando suas sete ligações dissulfeto (setas); os resíduos P1 nos subdomínios 1 e 2, fenilalanina (Phe53) e lisina (Lys26) e os resíduos de estabilização da região interna da estrutura do inibidor. Adaptado de Barbosa *et al.*, 2007.

Estudos espectroscópicos do BTCI mostraram que resíduos aromáticos estão consideravelmente expostos ao solvente, o que contribui para a formação oligomérica (Ventura *et al.*, 1984). Estados multiméricos do BTCI, com formatos elipsoidais, em equilíbrio entre as estruturas monoméricas, diméricas, triméricas e hexaméricas, foram identificados por espalhamento de luz (Ventura *et al.*, 1981) e por análise de Microscopia de Força Atômica (Silva *et al.*, 2005).

A estrutura tridimensional do BTCI em associação com a tripsina (Barbosa *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2007) e com a tripsina e a quimotripsina, simultaneamente, foram elucidadas (Esteves *et al.*, 2007; Esteves, 2010). A resolução estrutural de um complexo ternário de inibidor Bowman-Birk complexado simultaneamente com tripsina e quimotripsina foi a primeira relatada, na forma de uma tese e manuscrito em fase de preparação para publicação (Esteves, 2010), e poderá fornecer dados estruturais importantes para a compreensão do mecanismo de inibição do BTCI, o que permitirá avaliar o potencial desse inibidor em aplicações biotecnológicas.

Vários estudos recentes mostram o potencial do BTCI em aplicações biotecnológicas na área da agricultura e da saúde humana. O trabalho de Franco e colaboradores (2003) mostrou a aplicação em potencial do BTCI no

controle de pragas. Larvas do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), ao ingerir alimentos com BTCI, apresentaram redução de peso de aproximadamente 46% e alterações na morfologia do tecido intestinal. Os insetos adultos, quando alimentados com BTCI, apresentaram taxa de mortalidade dose-dependente, onde a concentração máxima de inibidor administrada (100  $\mu$ M) causou 62% de mortalidade (Franco *et al.*, 2003).

Efeitos do BTCI *in vivo* na homeostase utilizando o sistema renal de rato perfundido como modelo foram recentemente relatados (Carvalho *et al.*, 2008). Esse inibidor potencializou o efeito da guanilina, um peptídeo que participa da regulação da homeostase de fluidos e eletrólitos, promovendo um aumento no fluxo urinário e na excreção de  $\text{Na}^+$ . Adicionalmente, o BTCI promoveu, na ausência de guanilina, o aumento da excreção de  $\text{Na}^+$  e da taxa de filtração glomerular, mostrando que proteases semelhantes à quimiotripsina desempenham papel fundamental no metabolismo renal de guanilinas e que o inibidor BTCI apresenta efeitos na homeostase renal (Carvalho *et al.*, 2008).

O tratamento de células de câncer de mama MCF-7, com 200  $\mu$ M de BTCI por 72 horas, mostrou que esse inibidor induziu significativa redução da viabilidade e proliferação celular (bloqueada na fase S e G2/M). Esses efeitos citostáticos foram acompanhados por modificações morfológicas incluindo alterações na estrutura nuclear, fragmentação da membrana plasmática, presença de vesículas com membrana dupla, inchaço de mitocôndrias e aumento do tamanho dos lisossomos. Fragmentação do DNA, aumento do número de células anexina-V+, redução do potencial de membrana e acidificação do citoplasma também foram detectados. Esses resultados indicam o efeito do BTCI na indução de morte celular por apoptose associada com várias alterações morfológicas e permeabilização da membrana lisossomal. Todos esses dados confirmam que o BTCI apresenta efeitos anticarcinogênicos em células de câncer de mama e por essa razão esse inibidor é um importante alvo de estudos visando a busca de novas drogas e alternativas terapêuticas contra o câncer (Joanitti *et al.*, 2010).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Evidências epidemiológicas indicam que a dieta rica em produtos de leguminosas está associada a baixas incidências e mortalidade por câncer, principalmente câncer de mama, de cólon e de próstata (Kennedy, 1993b; Messina *et al.*, 1994; Messina e Barnes, 1991). Por esse motivo, derivados de leguminosas, como os inibidores de protease da família Bowman-Birk, tornaram-se alvo de pesquisas na atuação dessas moléculas na viabilidade e proliferação de células carcinogênicas.

Vários estudos mostram que diferentes inibidores de proteases na forma purificada suprimem a carcinogênese, entre eles o Inibidor Bowman-Birk, BBI tem sido o mais estudado (Dittmann *et al.*, 2005; Kennedy, 1993b; Kennedy, 1998; Saito *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 1988). O mecanismo molecular no qual esse inibidor está envolvido, que leva células carcinogênicas à morte celular, ainda não está elucidado. Entretanto, foi reportado que parte desse mecanismo poderia estar associada com a ação inibitória do BBI na atividade quimotripsina-*like* do proteassoma 26S de células de câncer de mama (MCF-7) *in vitro* e *in vivo* (Chen, *et al.* 2005). Além disso, esse inibidor atenua a atividade da ERK1/2 (Proteína Ativada por Mitógeno – MAP, relacionada a sinais extracelulares), por meio da acumulação de MKP-1 (MAP - quinase fosfatase-1), derivada da inibição da via ubiquitina-proteassoma, o que resulta na parada do ciclo celular de células MCF-7 (Chen, *et al.* 2005).

Estudos recentes desenvolvidos no nosso grupo de Biofísica Molecular da UnB mostram que o inibidor da família Bowman-Birk BTCI (Black-eyed pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor) apresenta atividade anticarcinogênica, com diminuição da proliferação e viabilidade de células de câncer de mama *in vitro* (Joanitti *et al.*, 2010). No entanto, nenhum estudo no nível molecular foi ainda realizado para compreensão de como esse inibidor atua nas células de câncer.

O BTCI apresenta grande potencial para várias aplicações, o que tem sido indicado pelos estudos desenvolvidos pelo grupo de Biofísica Estrutural da UnB, há mais de 40 anos, inicialmente supervisionados pelo Prof. Manuel M. Ventura e atualmente sob a coordenação da Prof<sup>a</sup>. Sonia Maria de Freitas. O inibidor BTCI foi primeiramente purificado, a partir de sementes de *Vigna*

*unguiculata*, por Ventura e Xavier-Filho (Ventura e Xavier-Filho, 1966). Desde então, diversos estudos de caracterização bioquímica e biofísica desse inibidor e da interação com proteases-alvo foram realizados. Esses estudos mostraram que o BTCI é uma molécula estável que inibe tripsina e quimotripsina, simultaneamente (Freitas *et al.*; 1997; Freitas *et al.*, 1999; Martin e Ventura, 1986; Mizuta *et al.*, 1980; Ventura *et al.*, 1975). Em 1987, a sequência completa de aminoácidos do BTCI foi elucidada (Morhy e Ventura, 1987), e a posterior resolução da estrutura cristalográfica desse inibidor por difração de Raios-X está sendo fundamental para melhor compreensão do seu mecanismo de inibição.

Os primeiros trabalhos de cristalização e resolução da estrutura tridimensional desse inibidor foram realizados em associação com a tripsina (Barbosa *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2007) e recentemente, em associação com tripsina e quimotripsina, formando um complexo ternário (o único elucidado até o momento) (Esteves *et al.*, 2007; Esteves, 2010). A condução do estudo científico desse inibidor, primeiramente com as caracterizações físico-químicas básicas e posteriores análises no nível atômico molecular estrutural, como a cristalografia de raios-X, permitem um amplo conhecimento da molécula, associando a estrutura molecular e o mecanismo de ação com aplicações biotecnológicas do inibidor. Estudos de efeitos do BTCI em três linhas de aplicações biotecnológicas já foram relatados: controle biológico, homeostase em modelos de sistema renal e câncer. O BTCI apresentou efeito inibitório no crescimento e desenvolvimento de larvas de *Anthonomus grandis*, conhecido como “a praga do bicudo do algodoeiro”, o que indica seu potencial no uso dessas plantas transgênicas (Franco *et al.*, 2003). A guanilina (peptídeo envolvido na regulação da homeostase de fluidos e eletrólitos) quando pré-tratada com o BTCI promoveu um aumento do fluxo urinário e da excreção de Na<sup>+</sup> em ratos. Além disso, o BTCI provocou aumento, por si só, na taxa de filtração glomerular, indicando que esse inibidor apresenta efeitos na homeostase celular (Carvalho *et al.*, 2008). Joanitti e colaboradores (2010) mostraram que o BTCI também apresenta efeitos citostáticos e citotóxicos em células de câncer de mama MCF-7, indicando o potencial desse inibidor no tratamento desse câncer.

Diversos inibidores de protease, como o BTCl, têm demonstrado aplicações na terapia contra o câncer. Entretanto, existem poucos estudos na literatura que mostraram efeitos moleculares de inibidores Bowman-Birk em células cancerosas. Apenas o trabalho de Chen e colaboradores (2005) mostrou resultados relacionados a associação desse inibidor com a via ubiquitina-proteassoma, um dos mecanismos de controle do crescimento de células carcinogênicas, em células de câncer de mama da linhagem MCF-7. Considerando que o proteassoma é um complexo proteolítico fundamental para a homeostase celular, a interação do inibidor BBI com esse complexo pode alterar a viabilidade e o ciclo celular, caracterizando o efeito anticarcinogênico dessas moléculas nessas células especificamente. Vale ressaltar que células cancerosas são mais sensíveis à inibição do proteassoma do que células normais (An *et al.*, 1998; Delic *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2003; Soligo *et al.*, 2001).

Este trabalho ora apresentado foi motivado pela importância dos inibidores de proteases no controle da proliferação e viabilidade de células cancerígenas, e, principalmente pelo fato da atividade do proteassoma estar estritamente relacionada com a atividade dessas células e por essa estrutura macromolecular apresentar atividade proteásica do tipo quimotripsina e tripsina-*like*. A atividade inibitória do BTCl contra o complexo macromolecular proteassoma é aqui investigada, considerando as similaridades estruturais de inibidores da família Bowman-Birk e o resultado prévio da atividade inibitória do proteassoma pelo BBI.

A investigação dos efeitos do BTCl no proteassoma é uma das principais metas que norteiam esse trabalho. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito do BTCl na atividade anticarcinogênica, em particular na ação desse inibidor na atividade proteolítica do proteassoma, é fundamental para que o BTCl seja utilizado em aplicações terapêuticas contra o câncer.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudo da interação entre o BTCl e o proteassoma e análise das características físico-químicas e moleculares dessa associação.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- i)** Analisar a atividade proteolítica do proteassoma 20S na presença do BTCl.
- ii)** Calcular as constantes de afinidade da associação BTCl - proteassoma 20S.
- iii)** Analisar ensaios de atividade do proteassoma 20S na presença de peptídeos derivados do BTCl.
- iv)** Avaliar as características físico-químicas e hidrodinâmicas do complexo BTCl – proteassoma 20S por espalhamento dinâmico de luz.
- v)** Avaliar a estabilidade do proteassoma 20S por dicroísmo circular.
- vi)** Analisar, *in vitro*, onde ocorre a associação do BTCl com o proteassoma.
- vii)** Analisar, *in vitro*, os efeitos do BTCl e de peptídeos derivados desse inibidor na ubiquitinação de proteínas celulares.

## 4. EQUIPAMENTOS

**Tabela 1.** Equipamentos utilizados neste trabalho e os respectivos fabricantes.

<b>Equipamentos</b>	<b>Fabricante</b>
Balança Analítica Modelo AX-200	Shimadzu, JAP
Câmara de Neubauer	C. A. Hausser & Son, EUA
Centrífuga Centra MP4	IEC, EUA
Centrífuga Micromax	IEC, EUA
Coluna cromatográfica (3,5 x 23 cm)	BioRad, EUA
Espectrofotômetro Modelo V-530	JASCO, JAP
Espectrofotômetro Espectra Max M2	Molecular Devices, EUA
Estufa	Cellstar, EUA
Fluxo Laminar	Labconco, EUA
Agitador Modelo 314-820	Lab-Line Instruments, IND
Liquidificador	Metalurgia SIEMSEN, BRA
Microscópio Confocal de Fluorescência TCS SP5	Leica Microsystems, ALE
Microscópio óptico invertido Eclipse TS- 100	Nikon, JAP
pHgâmetro DM-22	Digimed, BRA
Espectropolarímetro Jasco 816	JASCO, JAP
DynaPro DLS System Modelo LSR	Wyatt Technology, EUA
Fonte de Eletroforese Modelo 1000/500	BioRad, EUA
iBlot Gel Transfer System	Invitrogen, EUA
Fotodocumentador	BioRad, EUA
Ultracentrífuga Himac CP 70	Hitachi, JAP
Ultracentrífuga Himac CR 21	Hitachi, JAP

## **5. MATERIAIS**

### **5.1 Soluções para cultivo de células**

#### **5.1.1 Solução de antibióticos**

Solução estoque: estreptomicina, 30 µg/mL e ampicilina, 100 µg/mL.

Solução de uso: Utilizou-se 100 µL de antibióticos da solução estoque para cada 100 mL de meio de cultura, resultando nas concentrações de estreptomicina a 30 ng/mL e ampicilina a 100 ng/mL.

A solução foi esterilizada por filtração usando o filtro Millipore 0,22 µm, distribuída assepticamente em alíquotas e armazenada a -20°C.

#### **5.1.2 Meio DMEM**

Meio DMEM (Gibco BRL) 13,4g; Piruvato de Sódio 0,11g; Bicarbonato de Sódio 3,7g; Água MilliQ para completar a solução para 1 L.

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e esse meio foi esterilizado por filtração utilizando um filtro Millipore 0,22 µm. Após a esterilização, foram adicionados soro fetal bovino (Gibco BRL) e a solução de antibióticos ao meio de cultura. Em seguida o meio foi distribuído em garrafas previamente esterilizadas e armazenado em 4°C.

#### **5.1.3 Verseno – EDTA**

Verseno – EDTA (pH 7,0) 2 mM; PBS 1X.

A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C por 20 min.

#### **5.1.4 Tripsina**

Solução estoque: tripsina 5%; PBS 1X.

O pH da solução foi ajustado para 7,8 – 8,0. A solução foi deixada a 4°C durante uma noite para decantação. No dia seguinte, recolheu-se o líquido (sem o precipitado) e o pH foi novamente conferido e ajustado, se necessário, para pH entre 7,4 e 7,6. A solução foi esterilizada utilizando-se o filtro Millipore 0,22 µm, alíquotada e armazenada a - 20°C.

#### **5.1.5 Verseno – tripsina**

Tripsina 0,1% em solução de Verseno – EDTA.

A solução Verseno-tripsina foi preparada com 0,4 mL de tripsina 5% (5.1.4) em 20 mL de Verseno – EDTA (5.1.3), para que a concentração final de tripsina ficasse em 0,1%.

### **5.2 Soluções para o ensaio de atividade**

#### **5.2.1 Tampão de ensaio para proteassoma (Proteasome Assay Buffer)**

Tri-HCl 20 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; NaN<sub>3</sub> 1 mM; DTT 1 mM.

#### **5.2.2 Solução de parada do proteassoma (Proteasome Assay Stop Solution)**

Ácido acético 4 mM; Acetato de sódio 29 mM.

### **5.3 Tampões utilizados para os ensaios de Dicroísmo Circular e Espalhamento Dinâmico de Luz**

KCl pH 2,0; Glicina HCl pH 3,0; Acetato de sódio, pH 4,0 - 6,0; Tris-HCl, pH 7,0 - 9,0; Glicina NaOH, pH 10 - 12. Para os ensaios de dicroísmo circular, os

tampões foram usados na concentração de 2 mM, e para o ensaio de espalhamento dinâmico de luz, os tampões foram utilizados na concentração de 20 mM.

#### **5.4 Soluções para Western Blotting**

##### **5.4.1 Tampão PBS (1X)**

NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM; KCl 2,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM

##### **5.4.2 Solução fixadora**

Metanol 10%, Ácido Acético 7%.

##### **5.4.3 Solução APB (Alcaline Phosphatase Buffer)**

NaCl 100 mM; Tris HCl 100 mM pH 9,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

##### **5.4.4 Solução reveladora de fosfatase alcalina**

BCIP (Invitrogen) 10%, NBT (Invitrogen) 10% em água Milli-Q.

#### **5.5 Soluções para eletroforese em géis de poliacrilamida**

##### **5.5.1 Tampão de amostra SDS-PAGE (1X)**

Tris HCl (pH 6,8) 0,08 M; Sacarose 12%; SDS 2%; β-mercaptoetanol 2%; Azul de Bromofeno 0,05%. O tampão foi armazenado em tubos de 15 mL a -20°C.

##### **5.5.2 Tampão de corrida SDS-PAGE (1X)**

Trizma Base 0,0375 M; Glicina 0,3 M; SDS 0,1 %. O pH do tampão foi ajustado para pH 8,3 e armazenado a -4°C.

### **5.5.3 Gel separador SDS-PAGE**

Tris HCl (pH 8,8) 0,375 M; SDS 1%; Acrilamida/bisacrilamida (39:1 p/p) 13% ou 8%; APS (Persulfato de Amônia) 0,045%; TEMED 0,075%.

### **5.5.4 Gel concentrador SDS-PAGE**

Tris HCl (pH 6,8) 0,125 M; SDS 1%; Acrilamida/bisacrilamida (39:1 p/p) 4% APS (Persulfato de Amônia) 0,072%; TEMED 0,12%.

## **6. METODOLOGIA**

### **6.1 Purificação de BTCl**

#### **6.1.1 Extrato bruto**

O BTCl foi purificado a partir do extrato bruto de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* - variedade Seridó). Essas sementes foram obtidas de um banco de sementes mantido pelo Departamento de Bioquímica da Universidade de Fortaleza. O extrato bruto das sementes de *V. unguiculata* foi obtido conforme metodologia descrita por Ventura e Xavier-Filho (1966). As sementes foram coletadas, secas e depois trituradas. As etapas para obtenção do extrato bruto são descritas a seguir:

- 1) 500g de sementes de *V. unguiculata* trituradas foram dissolvidas em 2 litros de água destilada na presença de inibidor de protease sintético em baixas concentrações (PMSF 200 mM) e a suspensão foi mantida sob agitação constante a 4°C por 12 horas.
- 2) Essa suspensão foi homogeneizada em liquidificador, filtrada em fralda de tecido de algodão e centrifugada a 8.000 g por 30 minutos a 4°C.
- 3) O sobrenadante foi submetido à precipitação gradativa com TCA (ácido tricloroacético) 2,5% e mantido a 4°C sob agitação por 1 hora.
- 4) A suspensão foi filtrada e submetida à precipitação com sulfato de amônio, na forma sólida, a 50%. Essa mistura foi mantida a agitação constante por 1 hora e depois foi centrifugada a 8.000 g por 40 minutos a 4°C.
- 5) O precipitado foi ressuspenso em água destilada, dialisado por 12 horas e liofilizado, correspondendo ao extrato bruto. Este foi então armazenado a -20°C até o uso.

### **6.1.2 Purificação do BTCl**

O BTCl foi purificado do extrato bruto conforme metodologia descrita por Ventura *et al.* (1966). A purificação foi realizada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose (3,5 x 23 cm), conforme descrito a seguir.

1) Ativação da resina: passou-se na coluna 100 mL de HCl 0,2 M; 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada; 100 mL de NaOH 0,2 M; 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada para retirar o excesso de solução; 15 mL de tampão fosfato 100 mM (10X), pH 7,3; 300 mL de tampão fosfato 10 mM (1X), pH 7,3.

2) Purificação do BTCl: dissolveu-se 300 mg de extrato bruto em 15 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,3, centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 10.000 g. A amostra foi então aplicada na coluna, lavada com 100 mL do mesmo tampão e submetida a um gradiente linear de 0 a 800 mM de NaCl, em um fluxo de 3,0 mL/min.

3) Leitura da absorbância: amostras de 3 mL por tubo foram coletadas e a absorbância lida em 280 nm. As frações correspondentes ao pico de eluição de BTCl foram dialisadas com água destilada por 12 horas, congeladas em banho de álcool a - 80°C e liofilizadas. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida (13%) desnaturante.

## **6.2 Obtenção de anticorpos anti-BTCl**

### **6.2.1 Imunização dos camundongos**

Soro pré-imune: Oito camundongos machos da linhagem Swiss foram utilizados para imunização. Com uma pipeta de vidro Pasteur, foi retirado aproximadamente 1 mL de sangue do canto do olho de seis camundongos. O soro pré-imune foi obtido da amostra de sangue coagulada, após ser armazenado a 4°C durante a noite. O soro foi então separado do coágulo e centrifugado a 10.000 g por 7 minutos e depois armazenado com glicerol na proporção 1:1 a -20°C.

Imunização: O BTCl purificado na concentração 0,1 µg/µL foi diluído em PBS 1X e complementado com adjuvante completo (Freund's Adjuvant) para



aumentar a resposta imunológica. Cinquenta  $\mu\text{L}$  de solução de BTCl em PBS 1X foram misturados com 50  $\mu\text{L}$  de adjuvante completo em vortex e aplicados em cada camundongo, subcutaneamente na coxa esquerda, totalizando oito camundongos. Após 15 dias, a imunização foi repetida com a solução de BTCl na concentração 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  em PBS 1X, adicionada de adjuvante incompleto (sem células mortas de *Mycobacterium tuberculosis*), na proporção 1:1. Os oito animais foram novamente imunizados, na coxa direita. A terceira imunização, 15 dias após a segunda, foi realizada com solução de BTCl em menor concentração (0,085  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), na ausência de adjuvantes.

Quinze dias após a última imunização, o sangue foi coletado da região cardíaca de cada camundongo. Esse sangue foi armazenado a 4°C por 12 horas para retração do coágulo. O soro foi então coletado e centrifugado a 10.000 g por 7 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado com glicerol na proporção 1:1 (soro:glicerol) à -20°C, correspondendo ao soro imunizado.

### **6.2.2 Purificação dos anticorpos anti-BTCl**

Em média, 40  $\mu\text{g}$  de BTCl purificado foram aplicados em dez poços de um gel de poliacrilamida 13% desnaturante, a fim de se obter uma concentração alta de proteína, totalizando 400  $\mu\text{g}$  de proteína total. O gel foi transferido a seco para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o equipamento iBlot Gel Transfer System, seguindo as instruções do fabricante. A membrana foi então bloqueada por 2 horas com PBS – leite desnatado 5%, à temperatura ambiente. O excesso de leite desnatado foi removido da membrana com 5 lavagens de PBS 1X. Depois, a membrana foi incubada com todo o soro obtido da imunização dos camundongos com BTCl, por 2 horas, à temperatura ambiente. O excesso de soro foi removido da membrana e armazenado à -20°C e a membrana foi lavada 5 vezes com PBS 1X. Os anticorpos anti-BTCl ligaram na proteína purificada na membrana e foram eluídos com 5 mL de tampão Glicina-HCl 0,2mM pH 2,8. A solução foi coletada e o pH foi ajustado com NaOH para 7,0. Essa solução foi então concentrada por Microcon®, da Millipore (filtro de centrifugação), com filtro de 30.000 Da e centrifugações de até 14.000 g, conforme recomendações do fabricante. O

material eluído, correspondente aos anticorpos purificados, foi aliqotado e armazenado a 4°C.

### **6.2.3 Confirmação da funcionalidade do anticorpo**

Um ensaio *Western Blotting* foi realizado para avaliar a especificidade do anticorpo anti-BTCI. Amostras de 10 µg de BTCI purificado (controle positivo), do soro pré-imune (controle negativo 1) e de extrato total de proteínas de fígado de camundongo (controle negativo 2), foram colocadas em gel de poliacrilamida 13% desnaturante. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento iBlot Gel Transfer System. A membrana foi fixada com solução fixadora (5.4.2) por 10 minutos, lavada com PBS e incubada com solução de bloqueio (PBS – leite desnatado 5%) por 2 horas à temperatura ambiente. A membrana foi posteriormente lavada 5 vezes com PBS 1X e incubada com o anticorpo anti-BTCI na concentração 1:100 à temperatura ambiente por 2 horas. O excesso de anticorpo e de solução não-ligada foi retirado com 5 lavagens de PBS 1X. O anticorpo secundário anti-camundongo marcado com fosfatase alcalina (ZYMED) foi incubado por 2 horas na temperatura ambiente na proporção de 1:1000. A membrana foi novamente lavada com PBS 1X por 5 vezes e a solução de revelação (5.4.4) foi colocada na membrana por 30 minutos para revelação da ligação do anticorpo ao BTCI purificado.

Para controle negativo, foi realizado um ensaio de *Western Blotting* (seguindo o mesmo procedimento descrito acima). Dez µg de BTCI purificado foram colocados em um gel de poliacrilamida 13% desnaturante e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Essa membrana foi então fixada, bloqueada e incubada com o soro pré-imune (na ausência de anticorpos anti-BTCI) e revelada com anticorpo conjugado com fosfatase alcalina e seu substrato.

### **6.3 Cultura de células**

Nesse estudo foram utilizadas células de câncer de mama da linhagem MCF-7, as quais foram obtidas do banco de células American Type Culture Collection (ATCC).

Alíquotas de células de câncer foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente à 37°C. Um mL de célula foi adicionado em 5 mL de meio de cultura DMEM (5.1.2) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (5.1.1). Em seguida, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

A cada 72 horas o meio de cultura foi trocado e as células foram sendo monitoradas em microscópio óptico invertido. Em seguida as células foram removidas com 1 mL de solução Verseno – Tripsina (5.1.5). Depois, acrescentou-se a mesma medida de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina e as células foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos e ressuspendidas em novo meio de cultura. As células foram então armazenadas em frasco maior de cultivo e colocadas novamente para crescer na estufa.

### **6.4 Obtenção do proteassoma 20S e peptídeos derivados do BTCl**

O proteassoma 20S utilizado nesse trabalho foi gentilmente cedido pela Dr<sup>a</sup>. Marilene Demasi do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, São Paulo - SP. O proteassoma 20S foi purificado de eritrócitos de cavalo por cromatografias em coluna de DEAE – Sepharose, Sephacryl TM S-400 (Amersham Biosciences) e uma coluna MonoQ em sistema HPLC, como previamente descrito por Demasi *et al.*, 2003. A amostra foi enviada em tampão Tris-HCl pH 7,5 e 20% de glicerol, na concentração de 1 mg/mL.

Dois peptídeos cíclicos foram desenhados utilizando-se como molde a molécula de BTCl. Os peptídeos foram denominados Pep1 e Pep2, apresentando atividade inibitória independente contra a quimotripsina e a tripsina, respectivamente (Joanitti, 2008).

Esses peptídeos foram sintetizados, purificados e liofilizados pela empresa GenScript (EUA) e ficaram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

## **6.5 Atividade inibitória do BTCl e peptídeos no proteassoma**

### **6.5.1 Ensaio de atividade**

Nesse ensaio, a atividade enzimática do proteassoma 20S foi medida nas três formas proteolíticas: quimotripsina-*like*, tripsina-*like* e peptidil-glutamil hidrolase, na presença do BTCl e de peptídeos derivados, em uma placa de 96 poços.

Para o controle negativo, foram utilizados somente os substratos do proteassoma (62,5  $\mu\text{g/ml}$ ): Boc-leu-arg-arg para tripsina, Z-leu-leu-glu- $\beta$ na para peptidil-glutamil hidrolase e Suc-leu-leu-val-tyr para quimotripsina em tampão de ensaio para proteassoma (5.2.1). O ensaio correspondente à amostra “controle positivo” foi realizado com 2  $\mu\text{g/mL}$  de proteassoma e os respectivos substratos. Os testes de inibição do proteassoma foram realizados com o BTCl nas concentrações de 2 - 30  $\mu\text{M}$ , do Pep1 e Pep2 nas concentrações de 50 - 1200  $\mu\text{g/mL}$  para cada um e também foi realizado um ensaio com ambos os peptídeos nas concentrações de 50 - 1200  $\mu\text{g/mL}$  de peptídeos, onde os mesmos foram colocados na proporção 1:1. Ao ensaio foram adicionados 2  $\mu\text{g/mL}$  de proteassoma e os respectivos substratos, sendo que o proteassoma foi colocado em um poço sem inibidores para avaliação de sua atividade proteolítica. Para controle da atividade inibitória do proteassoma, foram realizados ensaios com 10  $\mu\text{M}$  de MG 132, um inibidor sintético reversível e específico para essa molécula.

A reação ocorreu por 60 minutos à temperatura ambiente e foi interrompida com a solução de parada do ensaio de atividade do proteassoma (5.2.2). As amostras foram lidas em um espectrofluorímetro, no comprimento de onda de excitação de 380 nm e comprimento de onda de emissão de 480 nm para os substratos fluorogênicos de quimotripsina e tripsina. Para o

substrato peptidil-glutamil hidrolase, a emissão foi medida em 410 nm após excitação em 335 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 6.5.2 Cálculo da constante de inibição

As constantes de inibição do BTCl contra as enzimas citadas foram calculadas a partir das curvas de atividade ajustadas utilizando o programa GRAFIT (Versão 3.0.1.0). Esse programa calcula a constante de inibição ( $K_i$ ) utilizando a equação de Morrison (1969):

$$V_i/V_0 = 1 - \{E_t + I_t + K_i - [(E_t + I_t + K_i)^2 - 4 E_t I_t]^{1/2} / 2E_t \quad (1)$$

Onde  $V_i$  e  $V_0$  são as velocidades na presença e na ausência do inibidor, respectivamente;  $E_t$  corresponde à concentração total de enzima e  $I_t$  corresponde à concentração total do inibidor.

## 6.6 Espalhamento Dinâmico de Luz – EDL

O estudo utilizando o EDL foi realizado para avaliar a interação entre o proteossoma 20S e o BCTI, as características físico-químicas dessas moléculas, além da estabilidade do complexo formado por elas. O experimento foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), com o equipamento DynaPro modelo LSR, um detector de espalhamento de luz. A análise dos dados foi realizada utilizando o software Dynamics V6. A forma molecular da proteína utilizada foi a globular, em comprimento de onda de 800 nm.

As amostras de BTCl e proteossoma foram diluídas em tampão Tri-HCl 20 mM pH 7,5 (5.3); esterilizadas em filtro Millipore 0,22  $\mu$ m e adicionadas à cubeta de 120  $\mu$ L previamente lavada com detergente Hermax® e metanol e secada com ar comprimido. Os experimentos foram realizados com variações de temperatura (25 a 60°C), de NaCl (0 – 50 mM) e de pH (2 a 12). Os dados foram analisados a partir da relação entre o diâmetro hidrodinâmico e a intensidade de espalhamento da luz.

No EDL, o raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) de uma partícula é calculado a partir do coeficiente de difusão ( $D$ ) por meio da equação de Stokes-Einstein, onde  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura e  $f$  ( $= 6\pi\eta R_H$ ) é o coeficiente friccional para uma esfera compacta em meio viscoso.

$$D = kT/f \quad (2)$$

O sinal da intensidade da luz espalhada é dado pela intensidade  $I$ , em função do tempo  $t$ , através da seguinte equação, onde  $\tau$  é o decaimento do tempo:

$$G(\tau) = \int_0^{\infty} I(t)I(t + \tau)dt \quad (3)$$

Os dados obtidos pela curva de auto-correlação da intensidade de espalhamento de luz foram ajustados para “baseline” = 1,0 ( $\pm 0,005$ ) e SOS = 1000. O baseline 1,0 indica que a difusão das moléculas é detectada e autocorrelacionada com a sua posição inicial.

Para cada experimento foi feita uma média de 100 aquisições e a temperatura interna da amostra foi controlada por um sistema Peltier acoplado ao detector. As concentrações ideais de uso no EDL foram calculadas pelo programa “Optimization Calculator” do software. A concentração de proteassoma utilizada foi de 21,4 nM e a concentração mínima de BTCL detectada pelo aparelho foi de 15  $\mu$ M, devido ao seu tamanho reduzido. Concentrações menores de BTCL não eram identificadas pelo aparelho, portanto, o desaparecimento do pico do inibidor na presença do proteassoma 20S indica que parte dele está associada ao proteassoma, enquanto que o aparecimento do pico correspondente ao BTCL indica que praticamente todo o inibidor encontra-se na forma dissociada. Foram feitos ensaios com o inibidor variando a concentração de 15  $\mu$ M a 90  $\mu$ M.

## 6.7 Análise da estabilidade estrutural do proteassoma por Dicroísmo Circular (DC)

### 6.7.1 Análise da estrutura secundária

A análise estrutural do proteassoma em diferentes condições foi realizada no espectropolarímetro Jasco 816, com entrada para nitrogênio gasoso e acoplado a um sistema Peltier para controle da temperatura. O nitrogênio gasoso chega ao equipamento com uma temperatura de 25°C, após passar por uma serpentina em banho de água destilada. O nitrogênio substitui o oxigênio do interior do aparelho para evitar danos no sistema óptico devido à formação de ozônio, a qual ocorre quando há oxigênio na presença de comprimentos de onda entre 190 – 260 nm.

As amostras foram lidas em comprimento de onda longe do UV (190 a 260 nm) e o comprimento de onda com maior sinal dicróico foi fixado para a análise de desnaturação térmica. Os dados foram coletados em triplicata, onde o valor final era uma média aritmética dos valores obtidos. O sinal dicróico foi medido a uma velocidade de 100 nm/min e processado pelo programa Spectra Manager (JASCO).

As concentrações de proteassoma utilizadas nos ensaios variaram entre 0,04 e 0,06 mg/mL, com pHs entre 2 e 12 (tampões 5.3), em cubeta de quartzo de 1 mm. Os dados registrados em miligráus foram convertidos para elipticidade residual molar usando a seguinte equação:

$$[\theta]_m = 112 \cdot \theta / 10 \cdot C \cdot \ell \quad (4)$$

Onde,  $\theta$  é o sinal dicróico em milligráus,  $C$  é a concentração da amostra em miligramas por mililitro e  $\ell$  é a espessura da cubeta utilizada, em centímetros. Os dados foram corrigidos com a linha de base para que a contribuição do tampão fosse removida.

As porcentagens de estrutura secundária do proteassoma foram calculadas utilizando o software CDNN Spectra Deconvolution (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>; Institut für Biotechnologie, Alemanha), com a opção de tipo de sinal dicróico de elipticidade molar. Os

valores selecionados foram os que apresentaram somatório das porcentagens mais próximo de 100%.

### **6.7.2 Desnaturação térmica**

Ensaio de desnaturação térmica do proteossoma foram realizados em comprimentos de onda fixados para cada pH, conforme os espectros obtidos na região UV distante. Esses espectros foram acumulados quatro vezes e o espectro registrado foi a média aritmética desses valores.

Nesses ensaios as curvas de desnaturação térmica foram obtidas nos pHs 2 – 12 (tampões 5.3), elevando-se a temperatura de 25°C a 95°C. Espectros foram registrados na faixa de 190 - 260 nm a cada aumento de 10°C na temperatura.

A voltagem registrada pelo equipamento foi monitorada para não exceder 700 V, pois essa voltagem pode causar danos às lentes do equipamento. Os dados obtidos foram convertidos de miligraus para elipticidade molar, utilizando a equação (4).

### **6.8 Ensaio de citolocalização por imunofluorescência**

Para testes de citolocalização, células de câncer de mama da linhagem MCF-7 foram incubadas em uma placa de 24 poços contendo pequenas lamínulas ao fundo, para adesão dessas células. Seis poços foram utilizados: um sem o BTCl, os outros cinco com BTCl (200µM) incubado com as células por 2, 6, 12, 24 e 36 horas. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 3,7% por 1 hora à temperatura ambiente e novamente lavadas com PBS.

As células foram permeabilizadas com Triton-X 0,2% em PBS por 10 minutos para permitir a entrada dos anticorpos. As células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo primário: camundongo anti-BTCl, na proporção 1:100, e coelho anti-proteossoma (Affiniti - Biomol), na proporção 1:1000 em PBS e leite desnatado 1% à temperatura ambiente por 2 horas, e lavadas em seguida com PBS. O primeiro anticorpo secundário, cabra anti-



coelho conjugado com Alexa Fluor 633 (Invitrogen), em PBS e leite desnatado 1%, foi incubado por 2 horas. As células foram então lavadas 5 vezes com PBS. O segundo anticorpo secundário foi colocado: coelho anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen), em PBS e leite desnatado 1%, por 2 horas. Ambos os anticorpos secundários foram incubados no escuro, à temperatura ambiente, na proporção 1:300. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e água MilliQ.

As lamínulas foram retiradas cuidadosamente dos poços e colocadas sobre lâminas tratadas com uma gota de Prolong (Invitrogen), um fixador que contém corante de DNA (DAPI). Esse componente preserva a fluorescência do anticorpo secundário. As lâminas foram armazenadas a 4<sup>o</sup>C, cobertas por papel alumínio e visualizadas dois dias depois em um microscópio Confocal de Imunofluorescência.

As intensidades dos lasers do Microscópio Confocal de Fluorescência foram padronizadas para cada comprimento de onda. Assim, a variação de intensidade em cada lâmina pôde ser comparada experimentalmente. As imagens foram analisadas pelo programa ImageJ (processador de imagens baseado no Java, de domínio público), o qual calcula a média de intensidade de fluorescência de cada figura, permitindo a quantificação da intensidade de fluorescência de cada proteína marcada.

## **6.9 Efeito do BTC1 e peptídeos na ubiquitinação de proteínas celulares**

Células MCF-7 foram crescidas, conforme descrito anteriormente (item 6.3) e colocadas em placas estéreis de 12 poços. As células foram tratadas com BTC1 (200 µM), com Pep1 (400 µM), com Pep2 (400 µM) e com MG132 (10 µM) por 2 e 4 horas. Um grupo de células não foi tratado, correspondendo ao grupo controle. O ensaio foi realizado em duplicata.

Após o tratamento, foram adicionados 100 µL de tampão de amostra SDS-PAGE nas células para que as mesmas fossem lisadas e o extrato protéico total fosse preservado. O material foi submetido à sonicação para quebra de DNA, por 30 segundos, 3 vezes, com intervalos de repouso em gelo.

Depois, as amostras foram incubadas em água fervente (100°C) por 5 minutos, para desnaturação protéica.

As amostras foram aplicadas em gel de acrilamida 8% e o gel foi submetido à amperagem constante de 25 mA em temperatura ambiente. Geralmente, essa amperagem corresponde a uma voltagem inicial de 80 Volts e final de 200 Volts.

Após a corrida, o gel foi retirado da placa e colocado em um equipamento de transferência para membrana de Nitrocelulose, iBlot Gel Transfer System, Invitrogen. O procedimento foi realizado conforme o manual do equipamento. A transferência ocorreu em 6 minutos.

A membrana foi então colocada em solução fixadora (5.4.2) por 20 minutos, sob agitação branda à temperatura ambiente. A solução foi descartada e a membrana lavada com PBS 1X. A membrana foi então incubada com leite desnatado 5% em PBS 1X por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida essa membrana foi lavada com PBS e o anticorpo primário anti-ubiquitina em coelho (Sigma) foi adicionado na proporção 1:100 em PBS e leite desnatado 1%, à temperatura ambiente por 2 horas, sob agitação. A membrana foi lavada com PBS por 1 hora, com trocas da solução do tampão a cada 10 minutos. O anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (ZYMED) na proporção 1:1.000, em PBS - leite 1% foi adicionado e a membrana incubada por 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente.

A membrana foi novamente lavada por 1 hora com PBS para retirar todo o excesso de anticorpo secundário. A solução APB (5.4.3) foi adicionada à membrana por 1 minuto, e, em seguida, a solução reveladora de fosfatase alcalina (5.4.4) foi incubada por 20 minutos para visualização dos resultados. A membrana foi fotografada em fotodocumentador com luz branca, coberta com papel filtro e revestida em papel alumínio para armazenamento à 4°C.

Para controle da quantidade de proteína colocada em cada amostra do gel, a membrana foi marcada com anticorpo contra uma proteína do citoesqueleto, constitutivamente expressa, a  $\beta$ -tubulina. O anticorpo coelho anti- $\beta$ tubulina (Sigma) foi incubado à temperatura ambiente por 2 horas na proporção 1:1.000 em PBS e leite desnatado 1%. O excesso de anticorpo foi retirado por meio de 5 lavagens com PBS 1X e a membrana foi novamente

incubada com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (ZYMED) na proporção 1:1.000, em PBS - leite 1%, por 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. A membrana foi então novamente fotografada e armazenada em papel filtro a 4°C.

A quantificação relativa da intensidade de ubiquitinação em cada poço foi realizada com o programa ImageJ, o qual quantifica o número médio de *pixels* em cada região delimitada. A quantificação absoluta da intensidade de ubiquitinação foi marcada com uma área determinada correspondente a cada poço. Essa quantificação foi então dividida pela intensidade da banda da  $\beta$ -tubulina em cada poço, para a análise relativa. O controle negativo (sem inibidores) foi padronizado com intensidade de 100%.

#### **6.10 Sobreposição estrutural do BTCl e da ubiquitina**

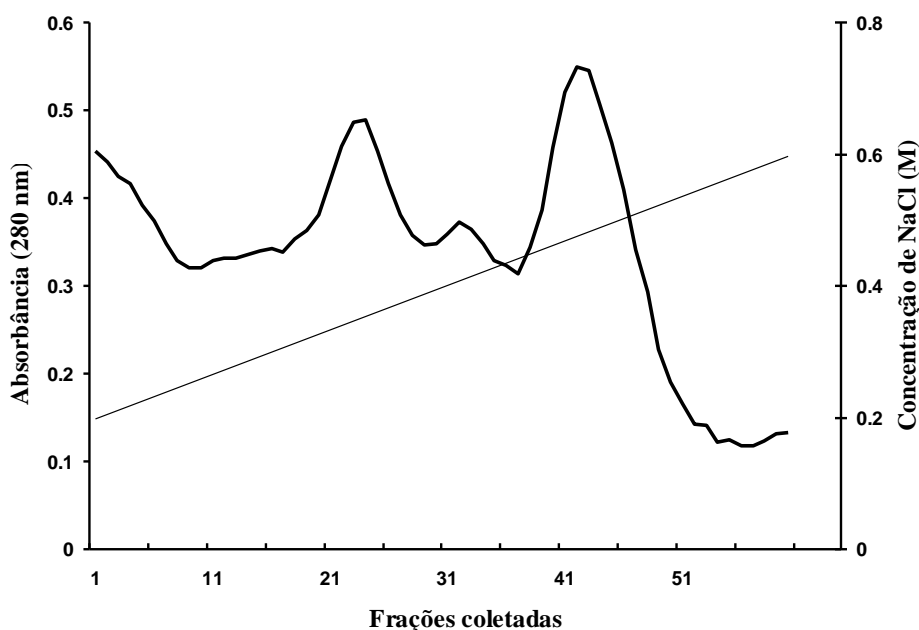
A sobreposição de estruturas terciárias do BTCl e da ubiquitina foi realizada utilizando o programa Top Match, um serviço de alinhamento e sobreposição de estruturas de proteínas, disponível gratuitamente na internet pelo site: <http://topmatch.services.came.sbg.ac.at/>.

O alinhamento foi realizado com o código do PDB (“Protein Data Bank”, Banco de Dados de Proteínas) da ubiquitina, 1UBQ, depositado por Vijay-Kumar *et al.*, 1987; e o código do BTCl, 2G81, depositado por Barbosa *et al.*, 2007. O código do PDB 2G81 corresponde ao complexo binário BTCl e a enzima tripsina. Portanto, para fazer a sobreposição estrutural somente com o inibidor, a contribuição dos átomos da tripsina foi removida do arquivo PDB em questão. O programa mostra a sobreposição das estruturas terciárias e faz o cálculo da porcentagem de similaridade estrutural e do root-mean-square error (RMSE), mostrando regiões de alta similaridade na imagem obtida.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Purificação e análise da pureza do BTCI

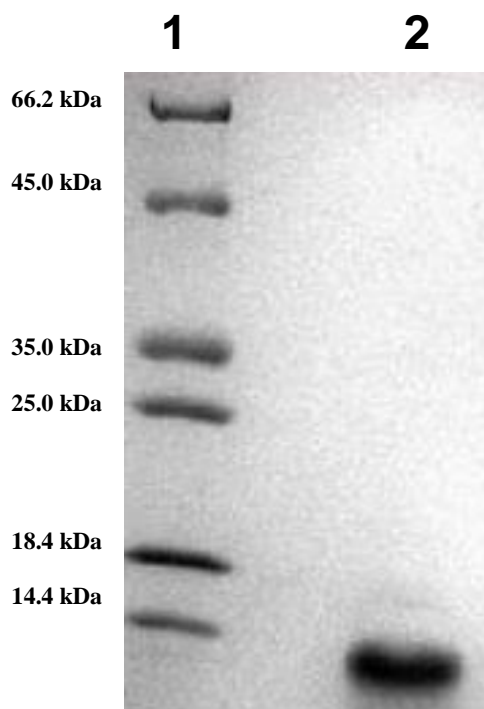
O BTCI foi purificado do extrato bruto de sementes de *Vigna unguiculata*, com rendimento de 18 a 36 mg de proteína para cada 500 g de semente. A figura 9 mostra o cromatograma obtido do processo de cromatografia de troca iônica do inibidor. O espectro representa as frações coletadas entre o gradiente de 0,2 a 0,6 M de NaCl, com três picos bem definidos, sendo o BTCI encontrado puro a partir da descida do terceiro pico (nas frações 43 a 54).



**Figura 9.** Purificação do BTCI por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) a partir do extrato bruto obtido de sementes de *Vigna unguiculata*. A eluição do inibidor ocorreu entre as frações 43 a 54 em gradiente linear de NaCl.

As amostras contendo o BTCI foram agrupadas, dialisadas, liofilizadas. A pureza do BTCI foi analisada em gel de poliacrilamida 13%, como mostrado na figura 10. O material obtido da cromatografia não apresentou contaminante

e a massa molecular do inibidor observada no gel foi próxima à massa real do BTCl, 9.1 kDa.

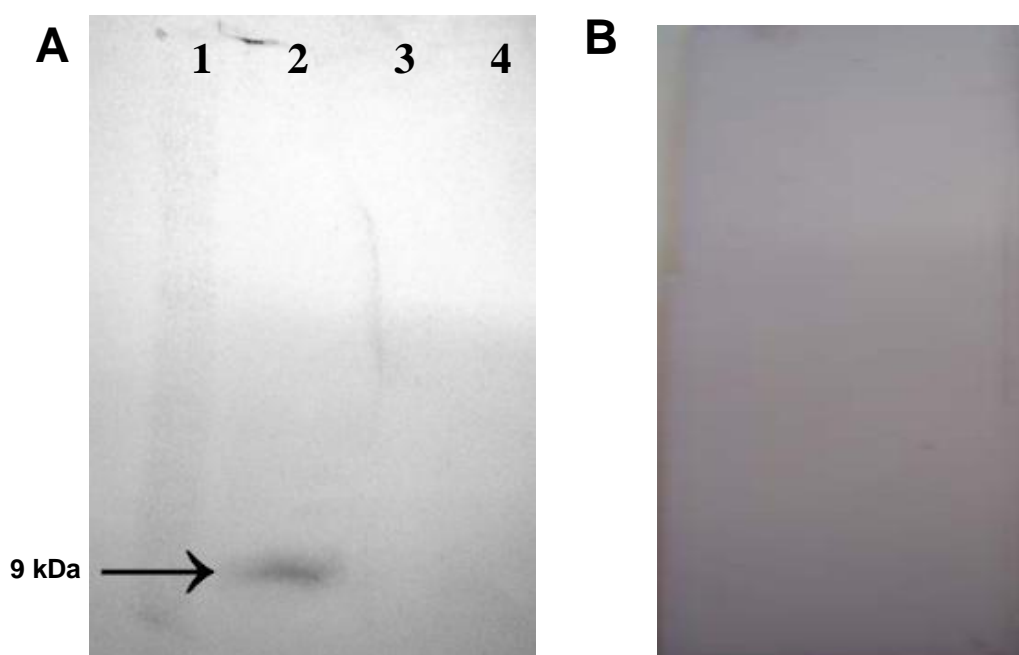


**Figura 10.** Análise da pureza do BTCl em gel de poliacrilamida 13 %. O poço 1 mostra o marcador de massa molecular e o poço 2, o BTCl purificado. Marcador molecular: 14.4 kDa (Lisozima), 18.4 kDa ( $\beta$ -lactoglobulina), 25.0 kDa (REase Bsp98I), 35.0 kDa (Lactato desidrogenase), 45.0 kDa (Ovalbumina), 66.2 kDa (Albumina de Soro Bovino).

## 7.2 Obtenção de anticorpos anti-BTCl

No total, foram obtidos 7 mL de soro imune de oito camundongos da linhagem Swiss, com anticorpos policlonais. Os anticorpos do soro imune foram purificados por meio da ligação dos mesmos em uma membrana de nitrocelulose com 400  $\mu$ g de BTCl purificado transferidos de um gel de poliacrilamida. Os anticorpos foram eluídos com tampão 0,2 M de glicina-HCl pH 2,8 e o pH da solução foi neutralizado. Para testar a funcionalidade desse anticorpo policlonal, foi realizado um ensaio de *Western Blotting*, onde foram aplicados nos poços do gel de poliacrilamida 13%, o marcador de massa

molecular, 10 µg de BTCI purificado, soro pré-ímune e extrato total de proteínas de fígado de camundongo, como controles negativos (figura 11 A). A marcação da fosfatase alcalina somente na região do BTCI indica que o anticorpo policlonal obtido é específico. O controle negativo, correspondente ao ensaio com o BTCI purificado transferido para uma membrana de nitrocelulose e a incubação com soro pré-ímune, está apresentado na figura 11 B. Esse resultado mostrou que não houve reação da fosfatase alcalina, o que indica que não havia anticorpos anti-BTCI no soro pré-ímune, e não estava ocorrendo reação inespecífica com outra proteína do soro.

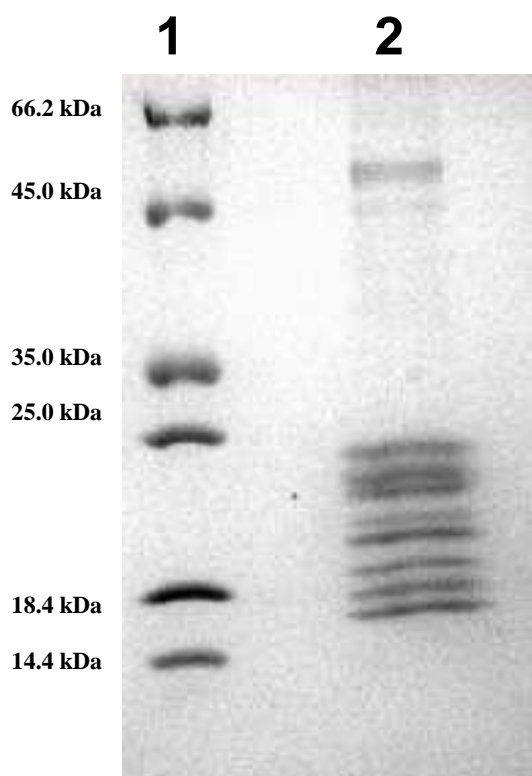


**Figura 11.** Atividade dos anticorpos policlonais anti-BTCI avaliada por *Western Blotting*. (A) Membrana de nitrocelulose indicando ligação do anticorpo com o BTCI (seta). 1: marcador de massa molecular; 2: BTCI puro; 3: soro pré-ímune; 4: extrato de proteínas totais de fígado de camundongo. (B) Membrana mostrando que não houve ligação inespecífica de outras proteínas do soro pré-ímune com o BTCI.

### 7.3 Obtenção do proteassoma 20S

Os ensaios de atividade inibitória do BTCI, análise estrutural do proteassoma e da sua interação com o inibidor foram realizados utilizando proteassoma 20S purificado de eritrócitos de equinos, por cromatografias

sequenciais. A pureza da amostra pode ser observada na figura 12, a qual mostra as subunidades proteassomais, em gel de poliacrilamida desnaturante 13%.



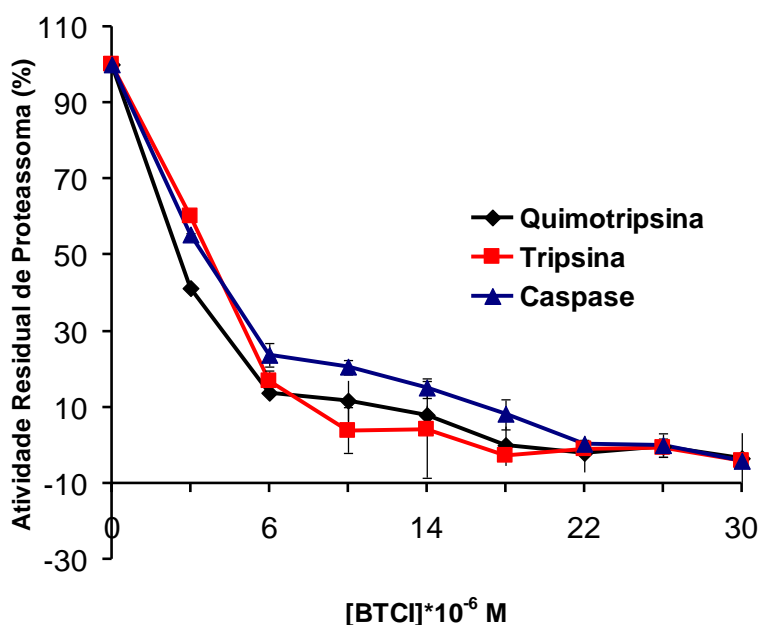
**Figura 12.** Proteassoma 20S purificado de eritrócito de cavalo. A amostra apresenta as subunidades proteassomais observadas no poço 2. O poço 1 corresponde ao marcador de massa molecular: 14.4 kDa (Lisozima), 18.4 kDa ( $\beta$ -lactoglobulina), 25.0 kDa (REase Bsp98I), 35.0 kDa (Lactato desidrogenase), 45.0 kDa (Ovalbumina), 66.2 kDa (Albumina de Soro Bovino).

## 7.4 Atividade inibitória do BTCl e de peptídeos sintéticos

### 7.4.1 Ensaio de atividade do BTCl

Ensaio da atividade proteásica do proteassoma foram realizados com substratos específicos para quimotripsina, tripsina e caspase na presença do BTCl.

Como mostrado na figura 13, o BTCI inibiu as atividades enzimáticas similares à quimotripsina, tripsina e caspase. A inibição do proteassoma foi total para as três enzimas, sendo a tripsina e a quimotripsina as mais fortemente inibidas. Esses resultados indicam o BTCI como um novo inibidor natural de proteassoma 20S.



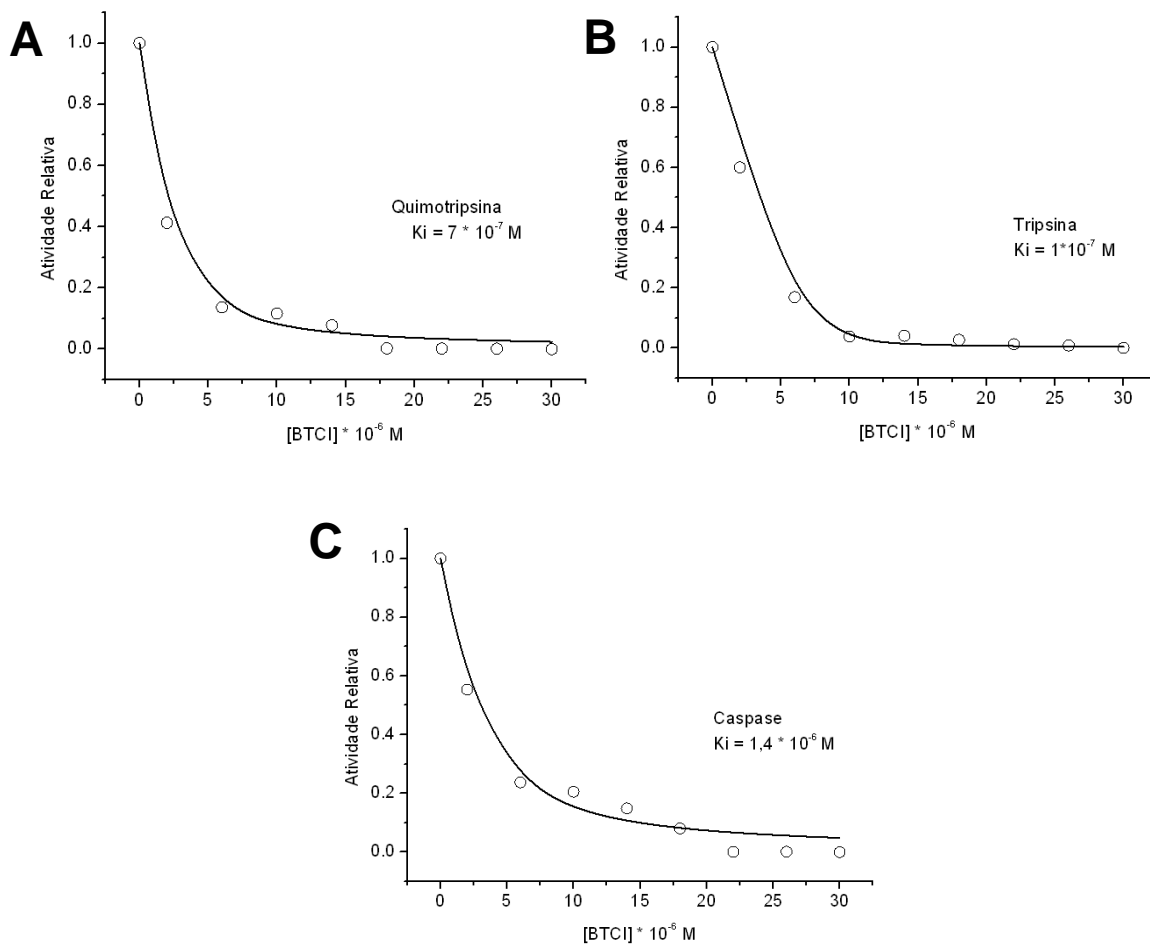
**Figura 13.** Atividade inibitória do BTCI contra o proteassoma. A atividade residual do proteassoma foi avaliada na presença de BTCI em concentrações variando de 0–30 x 10<sup>-6</sup> M, com 3 tipos de substratos, Suc-leu-leu-val-tyr para quimotripsina, Boc-leu-arg-arg para tripsina e Z-leu-leu-glu-βna para caspase. Em preto, atividade residual de quimotripsina, em vermelho, atividade residual de tripsina e em azul, atividade residual da caspase. As barras mostram o desvio padrão do ensaio realizado em triplicata.

#### 7.4.2 Cálculo da constante de inibição

O cálculo da constante de inibição ( $K_i$ ) do BTCI para cada atividade proteassomal foi realizado utilizando o programa Grafit, versão 3.0.1.0, e a equação de Morrison. Esse programa permite o ajuste dos dados experimentais para o cálculo da constante de inibição,  $K_i$ . A figura 14 mostra os ajustes das curvas experimentais e os respectivos valores das constantes de inibição do BTCI para cada atividade proteassomal. Os valores encontrados



para a atividade de quimotripsina foi igual a  $7,0 \times 10^{-7}$  M, de tripsina de  $1,0 \times 10^{-7}$  M (maior atividade inibitória), e para caspase de  $1,4 \times 10^{-6}$  M (menor atividade inibitória). Todas as constantes de inibição foram calculadas obtendo um Chi quadrado ( $\chi^2$ ) inferior a 0,012, mostrando que o ajuste representou corretamente os valores experimentais.



**Figura 14.** Atividade enzimática do proteassoma 20S na presença do BTCI em concentrações variando de 0 a  $30 \times 10^{-6}$  M. **(A)** Atividades similares da quimotripsina, **(B)** tripsina e **(C)** caspase. Relação entre a atividade inibitória do BTCI obtida experimentalmente (o) e ajustada pelo programa Grafit (---), para cálculo da constante de inibição ( $K_i$ ).

### 7.4.3 Ensaio de atividade dos peptídeos derivados

Ensaio enzimáticos com 2 peptídeos derivados do BTCl, o Pep1, que inibe somente a quimotripsina e o Pep2, que inibe apenas a tripsina, foram realizados para avaliação da atividade inibitória dos sítios reativos do BTCl contra o proteassoma. Os ensaios foram realizados com a concentração de 2 µg/mL de proteassoma 20S purificado e com os substratos específicos desse complexo (quimotripsina, tripsina e peptidil-glutamil hidrolase).

Os peptídeos foram preparados na concentração de 50 a 1200 µg/mL e utilizados em ensaios isolados e ensaios com adição das duas moléculas na proporção 1:1, para analisar o efeito sinérgico entre elas.

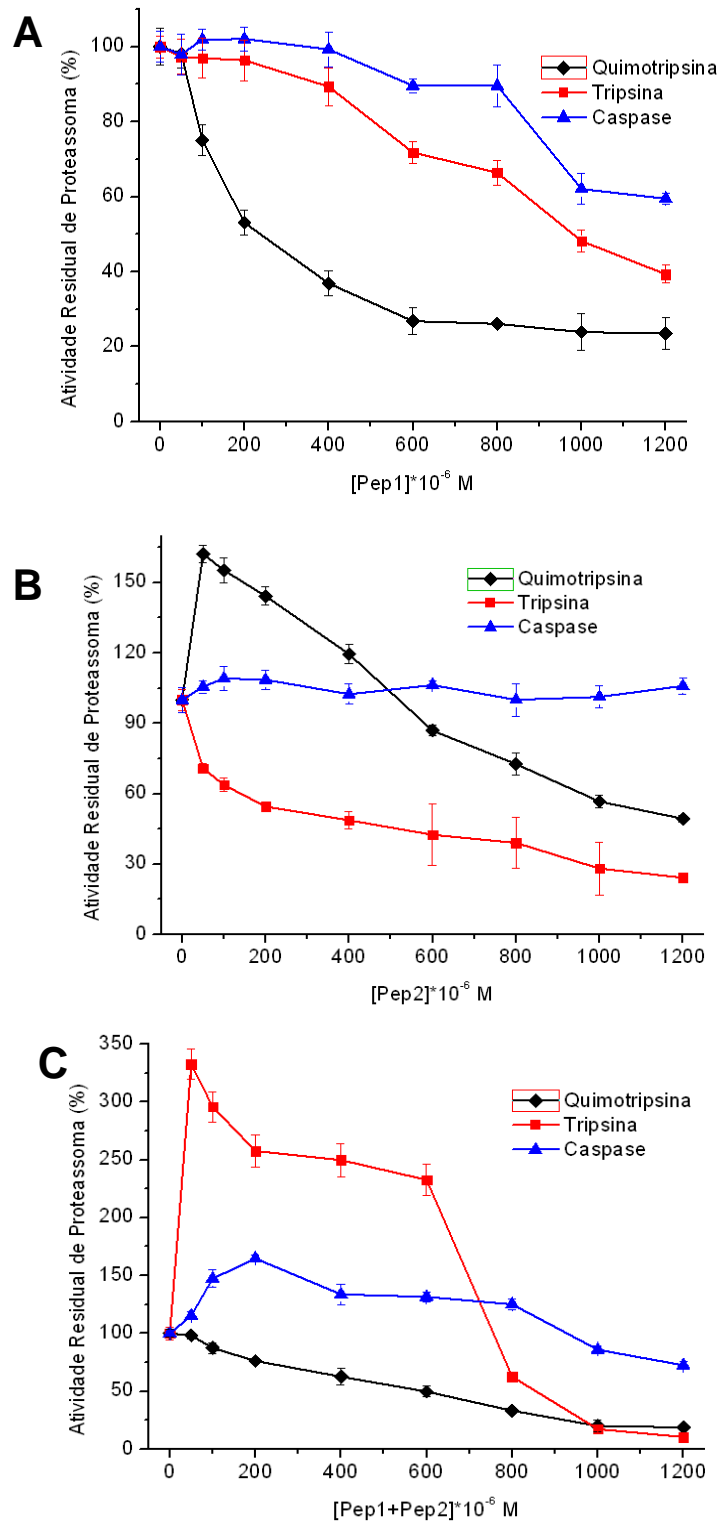
A figura 15 mostra que o Pep1, peptídeo que inibe a quimotripsina, inibiu a atividade quimotripsina-*like* do proteassoma, em aproximadamente 80% da atividade residual. Adicionalmente, esse peptídeo inibiu as atividades tripsina (aproximadamente 60%) e caspase-*like* (aproximadamente 25%), em menores proporções (figura 15 A).

O peptídeo que inibe a tripsina, Pep2, apresentou atividade inibitória contra a atividade tripsina-*like* do proteassoma, para valores próximos de 75%. Ele não apresentou efeito inibitório contra a atividade caspase-*like* e ativou a atividade quimotripsina-*like* do proteassoma em concentrações menores que 400 µM. A partir dessa concentração, o peptídeo inibiu a atividade quimotripsina do proteassoma em 50% (figura 15 B).

A inibição da atividade quimotripsina-*like* utilizando os dois peptídeos no mesmo ensaio foi de 82% da atividade proteolítica do proteassoma. Nessa condição ocorreu ativação da atividade caspase-*like* em até 160%, inicialmente, caindo em seguida para 90% dessa atividade residual do proteassoma. Adicionalmente, a atividade tripsina-*like* do proteassoma aumentou aproximadamente 3 vezes e caiu drasticamente a partir de 800 µM de peptídeos (figura 15 C).

Esses resultados sugerem que o Pep1 é capaz de inibir mais de uma atividade do proteassoma e o Pep2 é capaz de inibir a atividade tripsina-*like*, mas, aumenta a atividade quimotripsina-*like* do proteassoma. Além disso, os dados sugerem que o peptídeo Pep2 pode estar causando alguma mudança no sítio de atividade quimotripsina-*like*, aumentando sua atividade. Os resultados

obtidos com os peptídeos no mesmo ensaio indicam provável preferência pela inibição do sítio da quimotripsina, o que ativaria a atividade de outro sítio, o da tripsina, como é mostrado na figura 15 C. A partir de 800  $\mu\text{M}$  os peptídeos inibiram praticamente 90% da atividade tripsina-*like* do proteassoma.



**Figura 15.** Ensaio de atividade dos peptídeos derivados do BTCl com o proteassoma. A atividade residual do proteassoma foi avaliada em concentrações variadas dos peptídeos (0 – 1200 x 10<sup>-6</sup> M) com 3 tipos de substratos, Suc-leu-leu-val-tyr para quimotripsina, Boc-leu-arg-arg para tripsina e Z-leu-leu-glu-βna para caspase. Em preto, atividade residual de quimotripsina, em vermelho, atividade residual de tripsina e em azul, atividade residual da

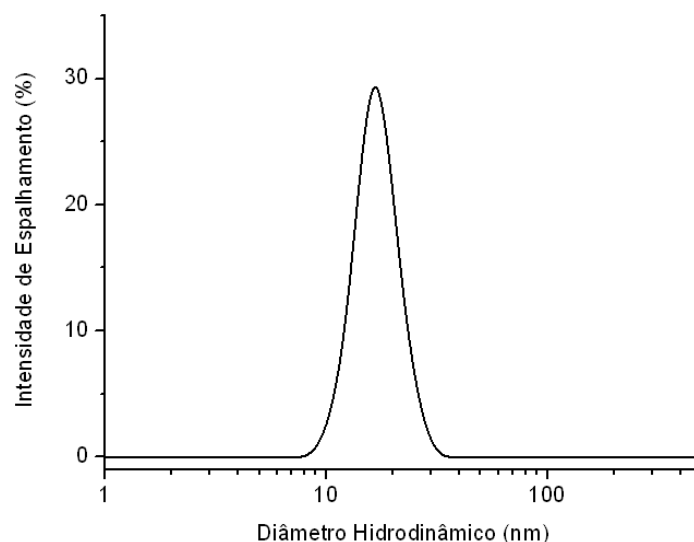
caspase. O Pep1 inibiu as 3 atividades proteassomais com intensidades diferentes, sendo a atividade quimotripsina-*like*, a mais inibida (**A**). O Pep2 inibiu a atividade tripsina-*like* e ativou a atividade quimotripsina-*like* inicialmente, inibindo-a em concentrações maiores (**B**). Atividade inibitória dos peptídeos adicionados no mesmo ensaio na proporção 1:1, onde ocorreu inibição da atividade quimotripsina-*like* e ativação da atividade de tripsina do proteassoma. Em concentrações maiores, ocorreu inibição dessa atividade (**C**). As barras mostram o desvio padrão do ensaio realizado em triplicata.

## **7.5 Interação entre o BTCl e o proteassoma analisada por Espalhamento Dinâmico de Luz – EDL**

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) permite a caracterização molecular hidrodinâmica de proteínas (raio hidrodinâmico e massa molecular) e o estudo de interações entre complexos na formação de estruturas oligoméricas. Os experimentos com EDL foram realizados para caracterizar o BTCl e o proteassoma 20S, estudar a formação do complexo protease-inibidor e avaliar a estabilidade do mesmo quanto à variação de temperatura, pH e força iônica.

### **7.5.1 Parâmetros hidrodinâmicos do proteassoma 20S**

O proteassoma 20S foi analisado em EDL na concentração de 21,4 nM, filtrado em filtro Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ , em solução Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (padronizada para estes ensaios). A curva de espalhamento de luz apresentada na figura 16 mostra o alto grau de pureza do proteassoma em solução, indicado pelo baixo valor da polidispersividade de 16,5 %, correspondendo à presença de uma única forma molecular (monodispersa). A massa molecular aproximada obtida foi de 505,2 kDa, distinta do valor reportado para essa estrutura molecular (~ 700 kDa). Essa diferença se deve à aproximação considerada para o cálculo dos parâmetros hidrodinâmicos utilizando o programa do equipamento, o qual considera a proteína na forma globular, mas, no entanto, a forma do proteassoma 20S é cilíndrica.



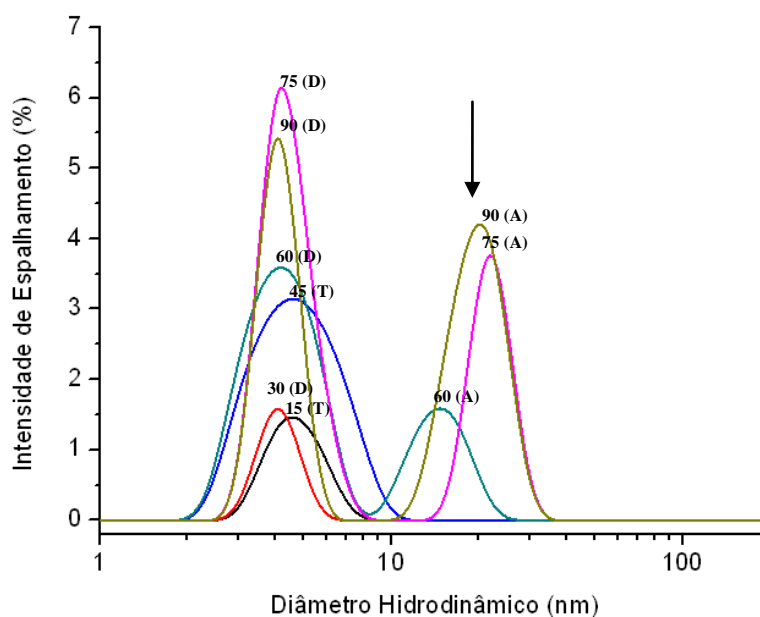
**Figura 16.** Intensidade de espalhamento de luz e diâmetro hidrodinâmico do proteassoma 20S. A curva mostra que não há contaminação da solução de proteassoma. A massa molecular estimada foi de 505,2 kDa e a polidispersividade de 16,5% (molécula monodispersa).

### 7.5.2 Parâmetros hidrodinâmicos do BTCl

As medidas dos parâmetros hidrodinâmicos do BTCl purificado foram realizadas em tampão Tris-HCl pH 7,5 e a amostra foi filtrada em filtro Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ . Devido ao seu tamanho reduzido, apenas amostras de inibidor com concentrações acima de 15  $\mu\text{M}$  foram detectadas. Dessa forma, nos ensaios com o proteassoma 20S e o BTCl na concentração mínima (15  $\mu\text{M}$ ), o aparecimento do pico de espalhamento correspondente ao BTCl indica que praticamente todas as moléculas do inibidor encontram-se na forma dissociada e o desaparecimento do pico do inibidor indica que parte dessa molécula está associada ao proteassoma.

O BTCl apresenta tendência de associação em formas diméricas e triméricas na faixa de concentração de 15 a 60  $\mu\text{M}$  e forma agregados a partir dessa última concentração (figura 17). Na concentração de 45  $\mu\text{M}$  o BTCl apresenta polidispersividade alta (28,4 %), indicando que nessa concentração o inibidor apresenta mais de uma forma molecular. As amostras em 15 e 30  $\mu\text{M}$  apresentaram polidispersividade menor que 14%, indicando serem monodispersas. A massa molecular do BTCl foi de aproximadamente 25 kDa

na concentração de 15  $\mu\text{M}$  e 18 kDa na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , correspondendo às formas trimérica e dimérica, respectivamente.



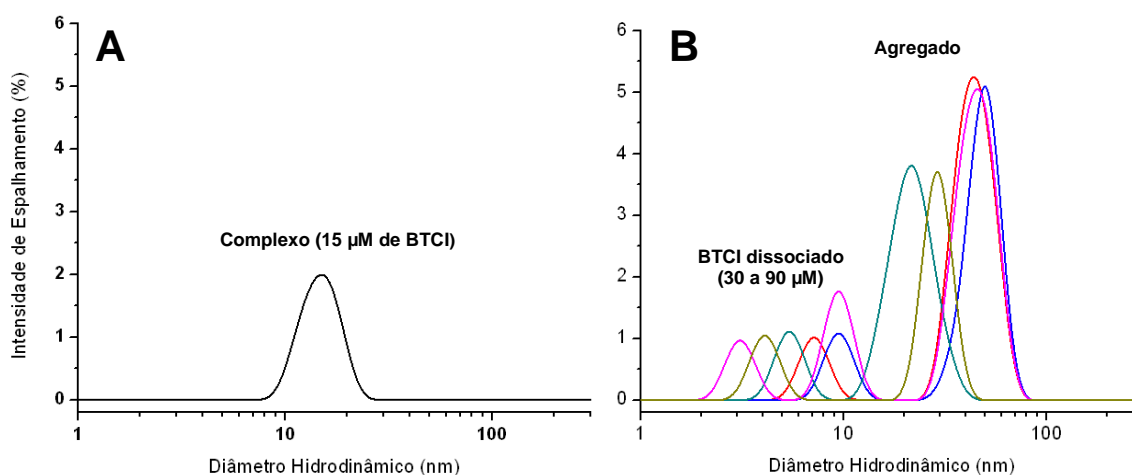
**Figura 17.** Intensidade de espalhamento de luz em relação ao diâmetro hidrodinâmico do BTCI em diversas concentrações. A 30  $\mu\text{M}$  o BTCI formou um dímero (vermelho) e a 15  $\mu\text{M}$  formou trimeros (preto). Em 45  $\mu\text{M}$ , o BTCI apresentou alta polidispersividade (azul) e nas concentrações menores foi caracterizado como uma molécula monodispersa. Os picos marcados pela seta mostram agregados do BTCI, nas concentrações de 60  $\mu\text{M}$  (verde), 75  $\mu\text{M}$  (rosa) e 90  $\mu\text{M}$  (dourado).

### 7.5.3 Formação do complexo BTCI - proteassoma 20S

A formação do complexo entre o BTCI e o proteassoma 20S foi monitorada por ELD, com a adição de concentrações crescentes de BTCI à amostra de proteassoma 20S, em tampão Tris-HCl pH 7,5.

A análise da formação do complexo foi realizada de forma indireta, onde o complexo foi identificado pelo desaparecimento do pico de espalhamento de luz correspondente ao BTCI. O desaparecimento do pico do inibidor indica que parte das moléculas estão ligadas ao proteassoma. A figura 18 A mostra a formação do complexo BTCI - Proteassoma 20S, na concentração de proteassoma padronizada (21,4 nM) e na concentração de 15  $\mu\text{M}$  do BTCI.

Concentrações superiores de inibidor resultam em formas de BTCI livre (figura 18 B), indicando que para os estudos de associação e estabilidade do complexo, a melhor concentração de BTCI é de 15  $\mu\text{M}$ , na qual o complexo BTCI com o proteassoma é claramente identificado. O complexo apresentou polidispersividade baixa de 13,5% e massa molecular de 462,5 kDa, próxima à massa que representa o proteassoma sozinho, considerando que a massa do inibidor é desprezível em relação ao proteassoma 20S.



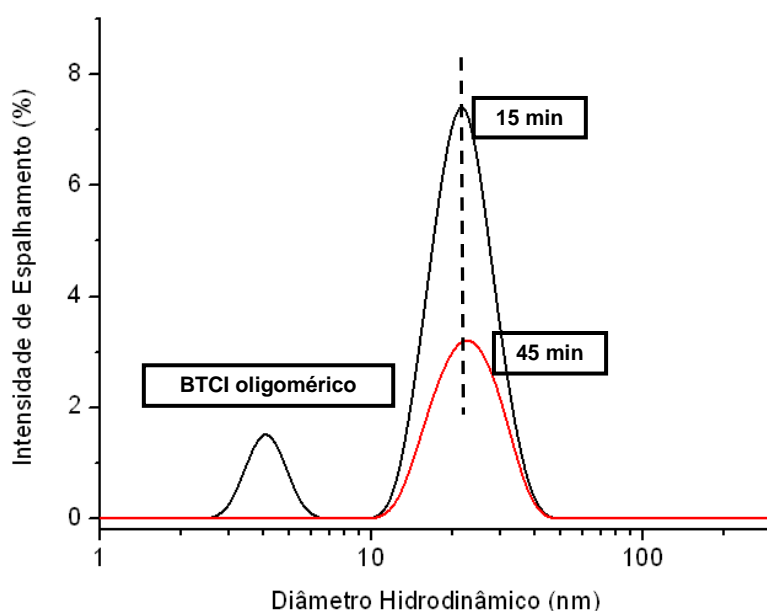
**Figura 18.** Formação do complexo BTCI - proteassoma 20S monitorada por ELD. O pico de espalhamento mostra a formação do complexo, na concentração de 15  $\mu\text{M}$  e 21 nM de BTCI e proteassoma, respectivamente (A). Todas as outras concentrações de BTCI resultaram em formas de inibidor dissociado, com diâmetro hidrodinâmico menor que 10 nm. Além disso, o BTCI nas concentrações acima de 30  $\mu\text{M}$  apresenta tendência de formação de estruturas oligoméricas (diâmetro hidrodinâmico de até  $\sim 8$  nm) e de agregados com o proteassoma, indicado pelos valores dos diâmetros hidrodinâmicos acima de 20 nm, distinto do valor encontrado para o proteassoma na forma monomérica (aproximadamente 15 nm de diâmetro hidrodinâmico). Complexo com 30  $\mu\text{M}$  de BTCI (vermelho), 45  $\mu\text{M}$  (azul), 60  $\mu\text{M}$  (verde), 75  $\mu\text{M}$  (rosa) e com 90  $\mu\text{M}$  de inibidor (dourado) (B).

#### 7.5.4 Cinética da formação do complexo

A formação do complexo BTCI – proteassoma pode ser observada pelo desaparecimento do pico correspondente ao diâmetro hidrodinâmico do inibidor, na concentração de 15  $\mu\text{M}$ . Entretanto, essa formação não é imediata,



visto que com apenas 15 minutos de incubação das duas moléculas, o pico de BTCl livre na forma dimérica (18 kDa) ainda é observado (figura 19). Quando essa incubação perdura por 45 minutos, o pico do inibidor não é mais observado. Medidas com intervalo menor que 30 minutos não foram possíveis visto que a coleta no equipamento ocorre em tempos superiores a 30 minutos. O deslocamento de diâmetro hidrodinâmico de 21,9 para 22,7 nm mostra que o BTCl provocou mudanças estruturais no proteassoma, indicando uma provável abertura do complexo proteolítico.



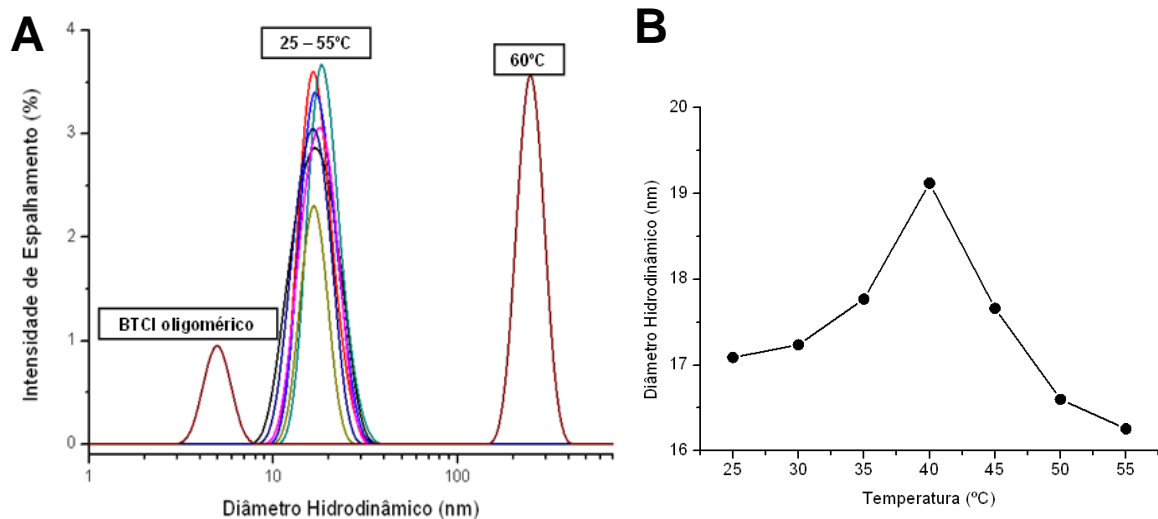
**Figura 19.** Formação do complexo BTCl – proteassoma após 45 minutos de incubação das moléculas (vermelho). Com 15 minutos de incubação (preto), o pico de BTCl é observado, indicando que a formação do complexo não é imediata. O pico que representa o diâmetro hidrodinâmico do complexo está levemente deslocado para a direita indicando mudança estrutural causada pela associação com o BTCl.

### 7.5.5 Estabilidade do complexo sob efeito da temperatura

A estabilidade térmica do complexo BTCl – proteassoma 20S foi analisada em diferentes temperaturas, com incubação das moléculas por 45 minutos, em solução tampão Tris-HCl pH 7,5. A varredura do espalhamento

dinâmico de luz foi feita na faixa de 25 - 60°C, com incrementos de 5°C (figura 20 A).

O complexo apresentou estabilidade estrutural até a temperatura de 55°C, onde foram observados picos sobrepostos com diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 15 nm (valor correspondente ao tamanho do proteassoma) e baixa polidispersividade (média de 17%), indicando que o complexo apresenta uma única forma molecular. Entretanto, variações mínimas de diâmetro hidrodinâmico nas temperaturas de 25°C a 55°C foram observadas (figura 20 B). De 25°C a 40 °C ocorre um aumento do diâmetro hidrodinâmico, indicando mudanças estruturais do complexo causadas pelo aumento da temperatura. De 40°C a 55°C ocorre perda de moléculas de água da camada de solvatação, o que explica a diminuição do diâmetro hidrodinâmico do complexo. A 60°C, o complexo é desfeito, visto que o pico correspondente ao BTCl oligomérico dissociado aparece (menor que 10 nm). Além disso, ocorre agregação do proteassoma, indicado pelo aumento do diâmetro hidrodinâmico de 15 nm (forma monomérica) para 248,5 nm.



**Figura 20.** Termoestabilidade do complexo BTCl – proteassoma 20S. O complexo apresentou estabilidade até 55°C. Em 60°C (cor vinho) ocorre dissociação do complexo, indicada pelo pico de espalhamento correspondente ao BTCl dissociado. A agregação do proteassoma é indicada pelo diâmetro hidrodinâmico de 248,5 nm. Temperatura de 25°C está representada em preto, 30°C, em vermelho, 35°C, em azul claro, 40°C em rosa, 45°C, em dourado e 55°C está na coloração azul escuro (A). De 25 a 55°C o complexo apresenta variações no diâmetro hidrodinâmico. O aumento do diâmetro indica mudanças estruturais (25°C – 40°C) e a diminuição desde, indica perda da camada de solvatação (40°C a 55°C) (B).

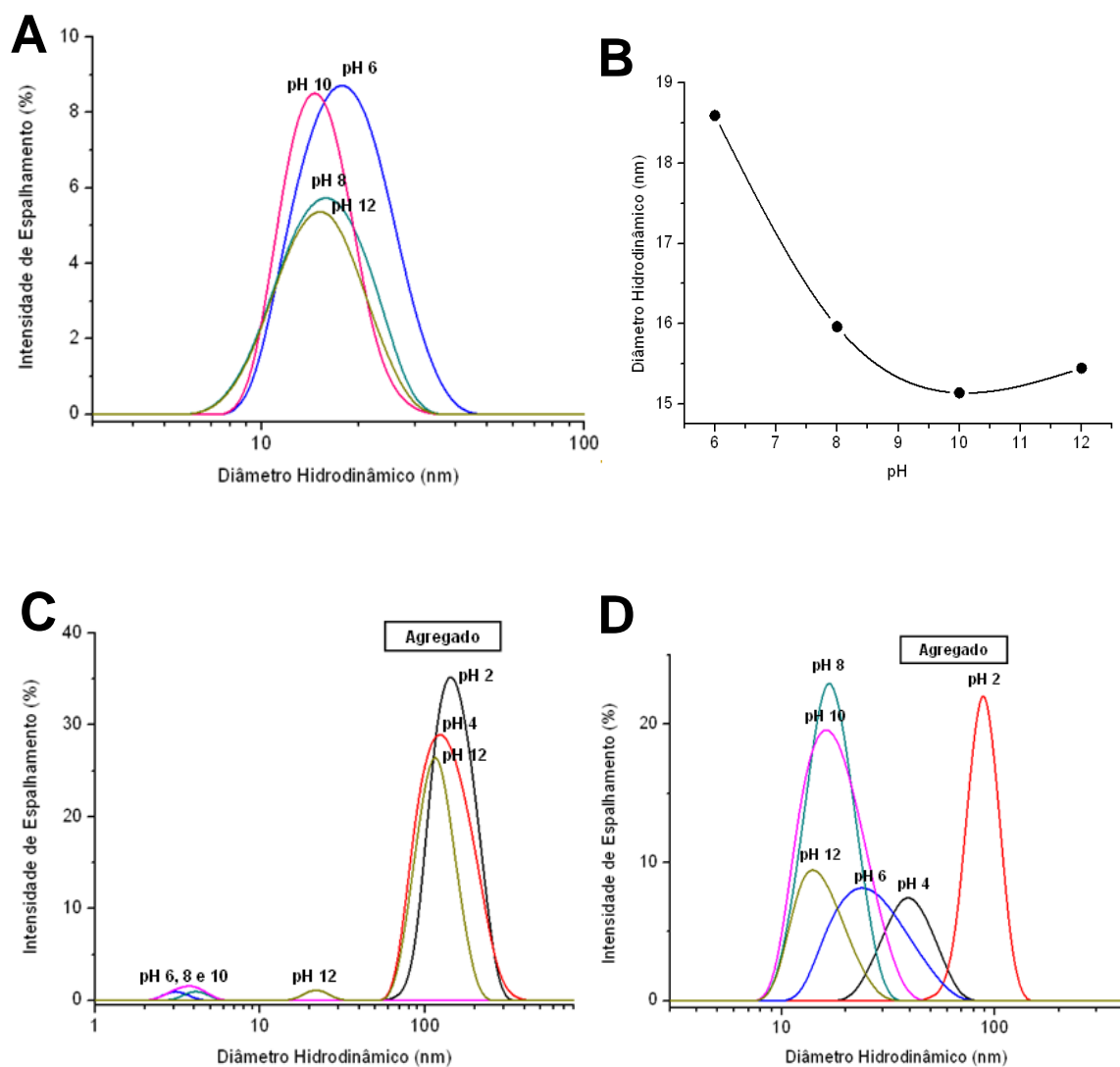
### 7.5.6 Estabilidade do complexo sob efeito do pH

Para avaliar a estabilidade do complexo em diferentes pHs, amostras de proteassoma (21,4 nM) e BTCl (15 µM) foram preparadas em tampões (item 5.4) com pH variando de pH 2 a pH 12. O complexo é estável na faixa de pH de 6 a 12, embora tenha apresentado polidispersividade mais alta, de 18 a 26%, indicando mais de uma forma molecular nessas condições (figura 21 A). O diâmetro hidrodinâmico diminuiu com o aumento do pH, indicando perda de moléculas de água na camada de solvatação devido a alterações das condições iônicas do meio, induzindo modificações conformacionais do complexo (figura 21 B).

Análises de amostras do BTCl em pHs 2 e 4 indicaram a forte tendência a agregação dessa molécula. Em pH 12 o BTCl apresentou tendência à

agregação, no entanto, outras formas moleculares aparecem com diâmetro hidrodinâmico de 22 nm (figura 21 C).

O proteassoma 20S nos pHs 2 e 4 aparece na forma de agregados de diâmetro hidrodinâmico superior a 40 nm. Em pHs 8, 10 e 12 o proteassoma apresentou diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 17 nm, correspondente às dimensões da molécula na forma monomérica. Em pH 6, o diâmetro hidrodinâmico médio do proteassoma foi de 27 nm, com alta polidispersividade (34,7%), indicando a presença de proteassoma na forma monomérica e dimérica (figura 21 D). Os dados de espalhamento de luz do proteassoma 20S e do BTC1 em pHs 2 e 4, mostraram que ambos aparecem somente na forma de agregados, provavelmente dificultando a formação do complexo dessas moléculas em pHs ácidos.



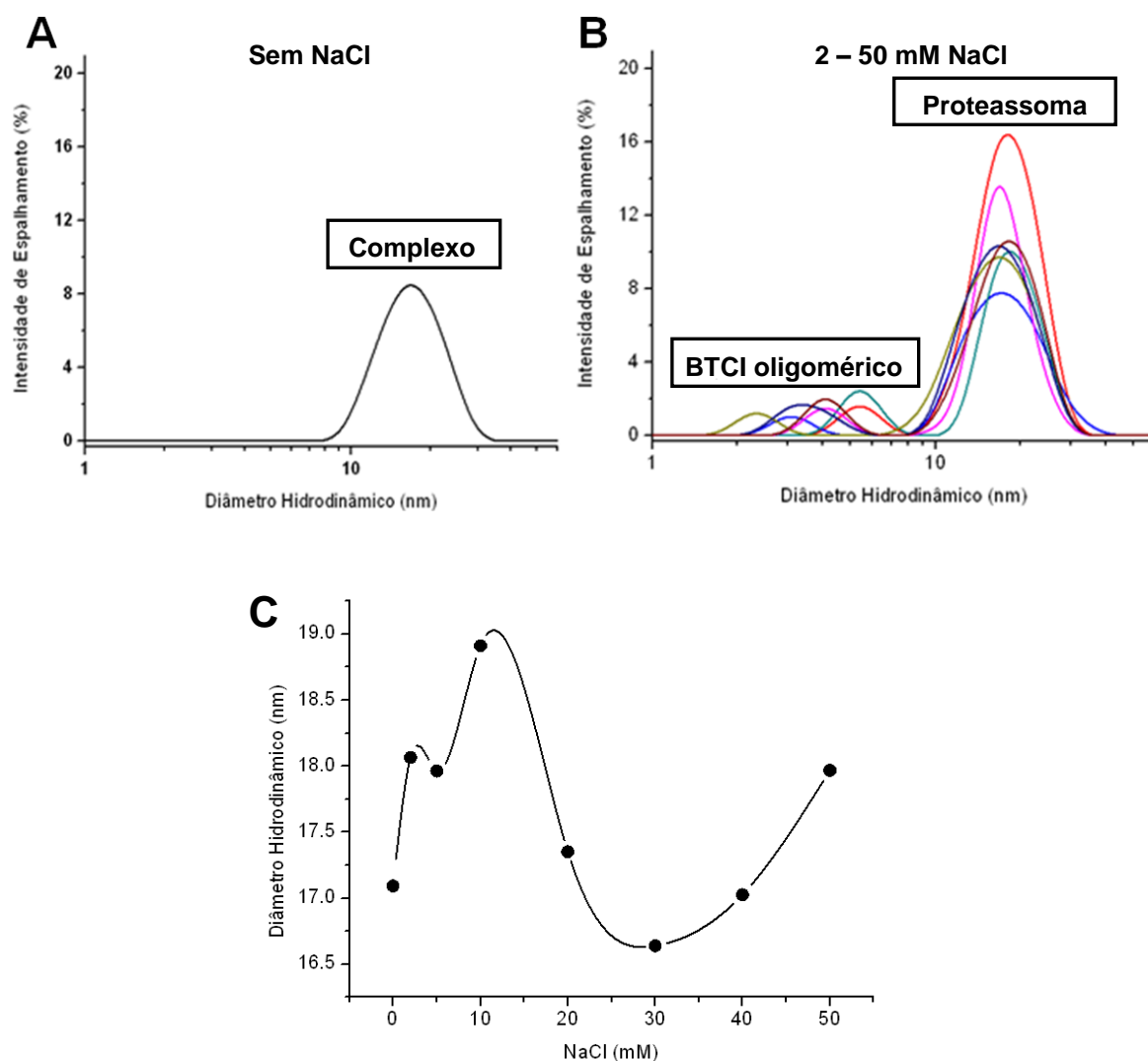
**Figura 21.** Estabilidade do BTCl, proteassoma 20S e complexo BTCl–proteassoma em diferentes pHs. O complexo apresentou estabilidade em pH 6 a 12 (A) com diminuição do diâmetro hidrodinâmico com o aumento do pH (B). O BTCl (C) e o proteassoma (D) apresentaram tendência a formação de agregados em pHs 2 e 4. O pH 2 está representado em todos os gráficos na coloração preta, pH 4, em vermelho, pH 6, em azul, pH 8 em verde, pH 10, em rosa e o pH 12 está representado em dourado.

### 7.5.7 Estabilidade do complexo sob efeito da força iônica

Para avaliar os efeitos do sal na estabilidade do complexo BTCl–proteassoma 20S, concentrações crescentes de NaCl (0 a 50 mM) foram adicionadas nas amostras do complexo em tampão Tris-HCl pH 7,5. O BTCl e o proteassoma permaneceram na forma do complexo na ausência de NaCl

(figura 22 A). No entanto, o complexo dissociou em concentrações de NaCl a partir de 2 mM, indicado pelos picos de espalhamento correspondentes ao BTCl na forma oligomérica dissociada (figura 22 B).

Os diâmetros hidrodinâmicos correspondentes ao proteassoma apresentaram polidispersividade maior que 17%, compatível com o proteassoma 20S na forma monomérica e outras formas, além de parte das moléculas na forma do complexo, com mudanças conformacionais, principalmente devido ao ambiente salino. O NaCl provocou aumento e diminuição de 2 nm do diâmetro hidrodinâmico do proteassoma 20S até concentrações de 10 mM e 30 mM, respectivamente, retornando em seguida ao valor basal, na concentração de 50 mM (figura 22C). Isso indica que o NaCl altera a conformação do proteassoma 20S, compatível com o aumento da flexibilidade da molécula, o que colabora para a dissociação do inibidor BTCl.



**Figura 22.** Efeito do NaCl na estabilidade do complexo BTCl–proteassoma. O BTCl foi identificado na forma oligomérica dissociada em todas as concentrações de NaCl, e complexado na ausência de NaCl (preto) (A). Concentrações de NaCl acima de 2 mM promoveram a dissociação do complexo (B). O NaCl altera a conformação do proteassoma, refletido pela variação do diâmetro hidrodinâmico (C). 2 mM de NaCl está representado pela cor vermelha; 5 mM, azul claro; 10 mM, verde; 20 mM, rosa; 30 mM, dourado; 40 mM, azul escuro; e 50 mM está apresentado na cor vinho.

Em conclusão, o BTCl se associa com o proteassoma 20S após 45 minutos de incubação e este complexo apresenta termoestabilidade até 55°C e estabilidade entre pHs 6 e 12. Além disso, o NaCl promove a dissociação do

complexo nas concentrações acima de 2 mM, provocando alteração da conformação do proteassoma.

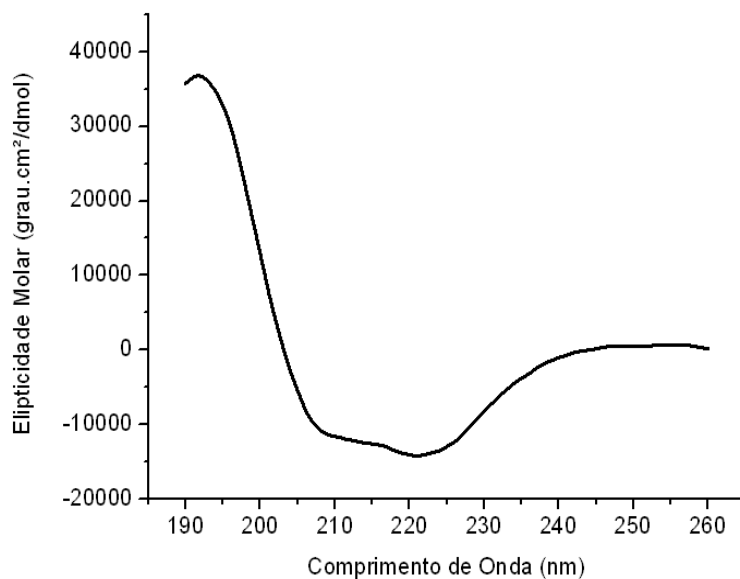
## **7.6 Estrutura e estabilidade do proteassoma analisada por Dicroísmo Circular (DC)**

A fim de se avaliar a estrutura secundária e a desnaturação térmica do proteassoma, experimentos de dicroísmo circular (DC) foram realizados em diferentes pHs (item 5.4), com amostras de proteassoma 20S purificado. O DC permite avaliar qual o efeito da temperatura na estrutura secundária do proteassoma 20S por meio da leitura da elipiticidade em comprimento de onda específico, além de permitir o cálculo da porcentagem de estruturas secundárias que formam esse complexo.

### **7.6.1 Análise da estrutura secundária do proteassoma 20S**

A análise de estrutura secundária do proteassoma 20S foi realizada em comprimento de onda UV distante (190 - 260 nm), à temperatura ambiente e em tampão Tris-HCl 2 mM, pH 7,5. O espectro obtido apresentou duas bandas dicróicas bem definidas em comprimentos de onda de 208 e 222 nm, indicando predominância de estrutura do tipo  $\alpha$ -hélice (figura 23).





**Figura 23.** Espectro dicróico do proteassoma 20S. Os dados foram coletados em comprimentos de onda UV distantes (190 - 260 nm). Duas bandas dicróicas em 208 e 222 nm são observadas, o que corresponde a uma estrutura secundária predominantemente formada por  $\alpha$ -hélices.

O cálculo de porcentagens de estrutura secundária do proteassoma 20S foi realizado com o programa CD Spectra Deconvolution. Os valores encontrados de estrutura secundária foram de predominância para  $\alpha$ -hélice (45,9 %), com aproximadamente 25 % de estruturas do tipo  $\beta$  e 29 % de estruturas randômicas (tabela 2).

**Tabela 2.** Cálculo da porcentagem de estruturas secundárias do proteassoma 20S usando o programa CD Spectra Deconvolution, avaliadas no espectro de 190 - 260 nm.

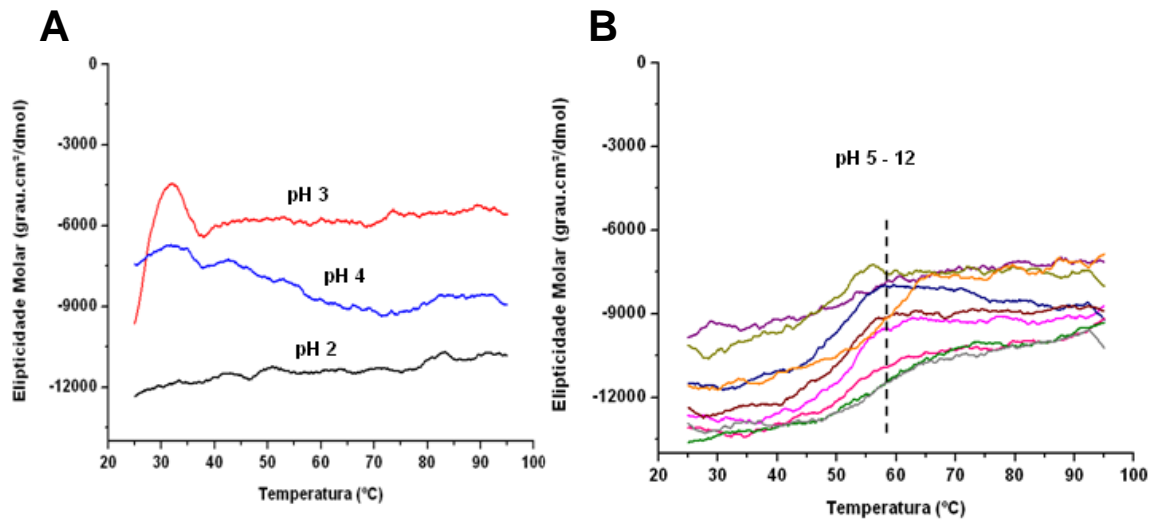
Porcentagens de Estruturas Secundárias	
$\alpha$ - hélices	45,9 %
Fitas $\beta$ Antiparalelas	4,1 %
Fitas $\beta$ Paralelas	6,6 %
Voltas $\beta$	14,5 %
Estruturas randômicas	28,6 %
Total	99,7 %

### 7.6.2 Desnaturação térmica

A figura 24 mostra a variação da elipticidade molar do proteassoma com o aumento da temperatura, em diferentes pHs. A diminuição da elipticidade molar indica a perda de estrutura secundária da proteína e quando atinge o valor próximo de zero, representa a perda estrutural total, correspondente à desnaturação protéica.

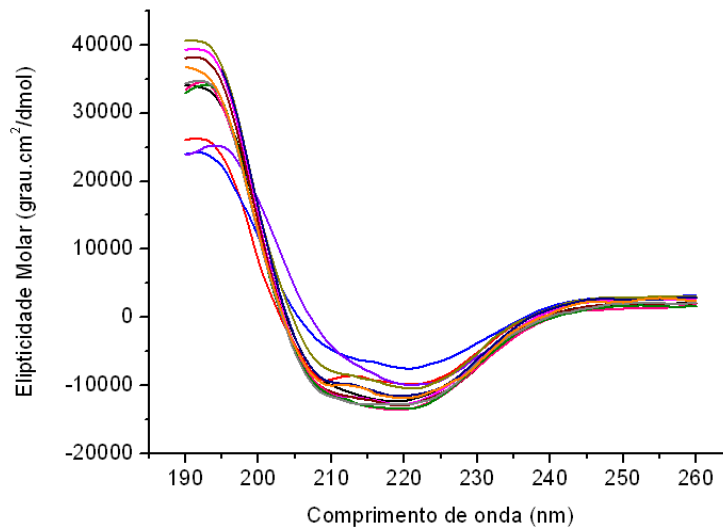
A figura abaixo mostra que não houve desnaturação total do proteassoma 20S, mas ocorreu uma perda de elipticidade molar para a maioria dos pHs (5 ao 12) (figura 24 B), na temperatura de 55°C. Essa perda pode indicar a separação das subunidades proteassomais, provavelmente dos 4 anéis protéicos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ , e  $\alpha$ ), formados cada um por sete subunidades.

Nos pHs mais ácidos (2, 3 e 4) (figura 24 A) as estruturas secundárias do proteassoma foram preservadas, indicado pela manutenção ou aumento da elipticidade molar do proteassoma 20S. Isso pode ser devido à tendência de autoassociação do proteassoma nesses pHs, como foi observado por espalhamento de luz dinâmico (figura 21 D). Esses dados obtidos indicam a estabilidade térmica do proteassoma 20S em pH ácidos.



**Figura 24.** Desnaturação térmica do proteassoma em diferentes pHs. A perda de elipticidade molar, nos pHs acima de 5, a partir da temperatura de 55°C (B), indica a diminuição de estrutura secundária e separação de subunidades proteassomais. A estrutura secundária do proteassoma em pHs 2 (preto), 3 (vermelho) e 4 (azul claro) (A) foi preservada com o aumento de temperatura, devido a tendência de auto-associação nesses pHs ácidos. pH 5 (roxo), pH 6 (lilás), pH 7 (dourado), pH 7,5 (azul escuro), pH 8 (vinho), pH 9 (rosa), pH 10 (verde), pH 11 (cinza) e pH 12 (laranja).

A variação de estrutura secundária do proteassoma com aumento da temperatura, em diferentes pHs, também foi avaliada. Observa-se pelos espectros de 190 a 260 nm do proteassoma em diferentes pHs, à temperatura ambiente, poucas variações de elipticidade molar nos espectros (figura 25).



**Figura 25.** Elipticidade molar do proteassoma 20S, em comprimentos de onda longe do UV, com variação do pH, à temperatura ambiente. pHs: 2, em preto; 3, em vermelho; 4, em azul; 5, em roxo; 6, em lilás; 7, em dourado; 7,5, em azul escuro; 8, em vinho; 9, em rosa; 10, em verde; 11, em cinza e 12, em laranja.

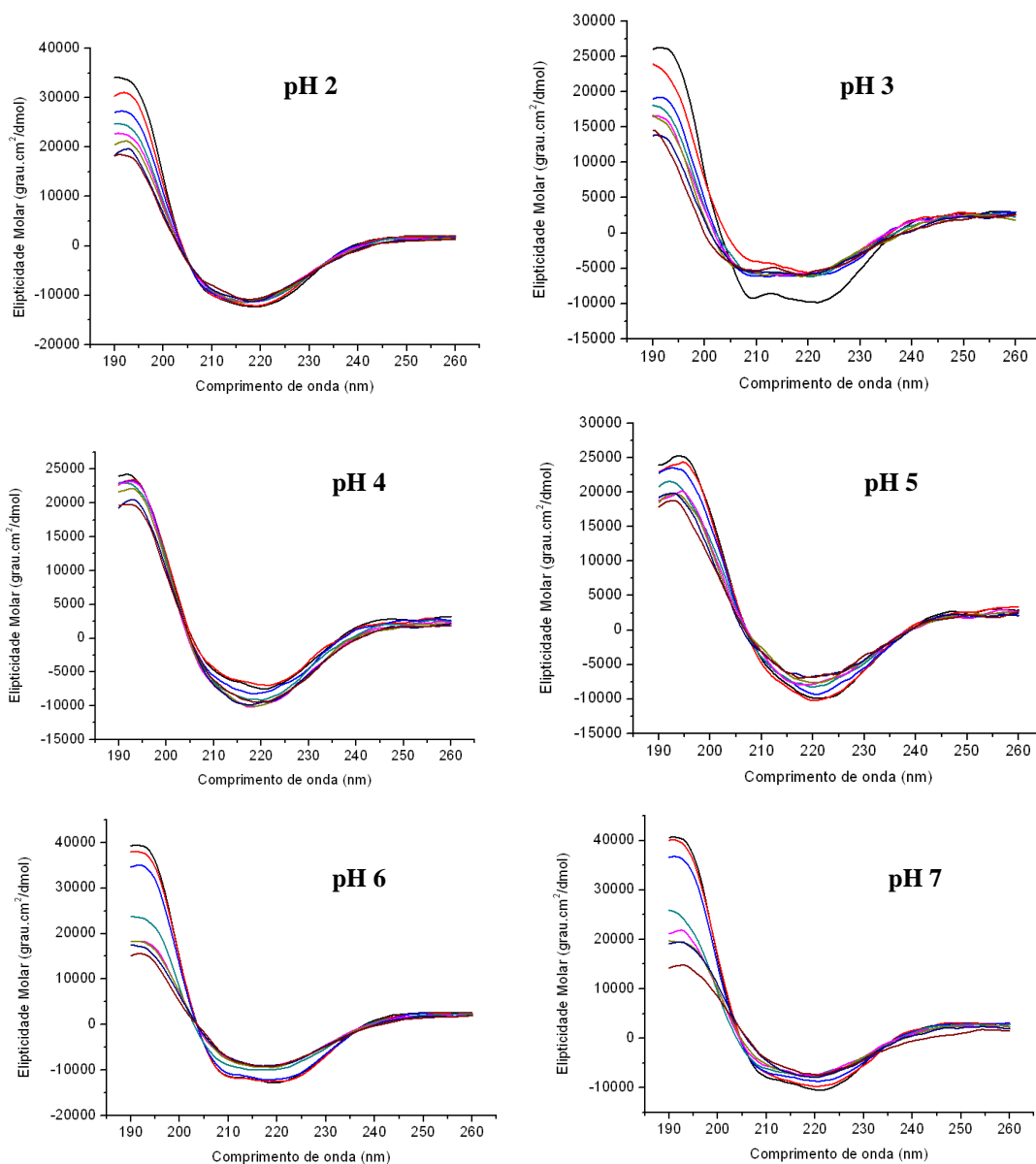
O cálculo da porcentagem de estruturas secundárias foi realizado para quantificar essa variação de estruturas em cada pH (tabela 3). A tabela mostra que as maiores variações estruturais, principalmente de  $\alpha$ -hélice, ocorreram em pHs ácidos (pH 2 ao pH 5), com perdas de até 10% dessa conformação e ganho de estruturas randômicas e fitas  $\beta$  antiparalelas. A maior perda de conformação de  $\alpha$ -hélice, ocorreu em pH 4, o que pode ser observado no espectro da figura 25, onde esse pH apresentou espectro com maior perda de elipticidade molar. Em pHs a partir de 6, observa-se mínima variação (aproximadamente 1%) da porcentagem de  $\alpha$ -hélices, e diminuição de aproximadamente 1,5 % de fitas  $\beta$  antiparalelas a partir do pH 9. Não há, portanto, grandes variações de porcentagem de estruturas secundárias em pHs neutros e básicos. Isso indica que a estrutura secundária das subunidades do proteassoma 20S é preservada nessas condições, como mostrado nos espectros da figura 25, com variações mínimas de elipticidade molar nos diferentes pHs.

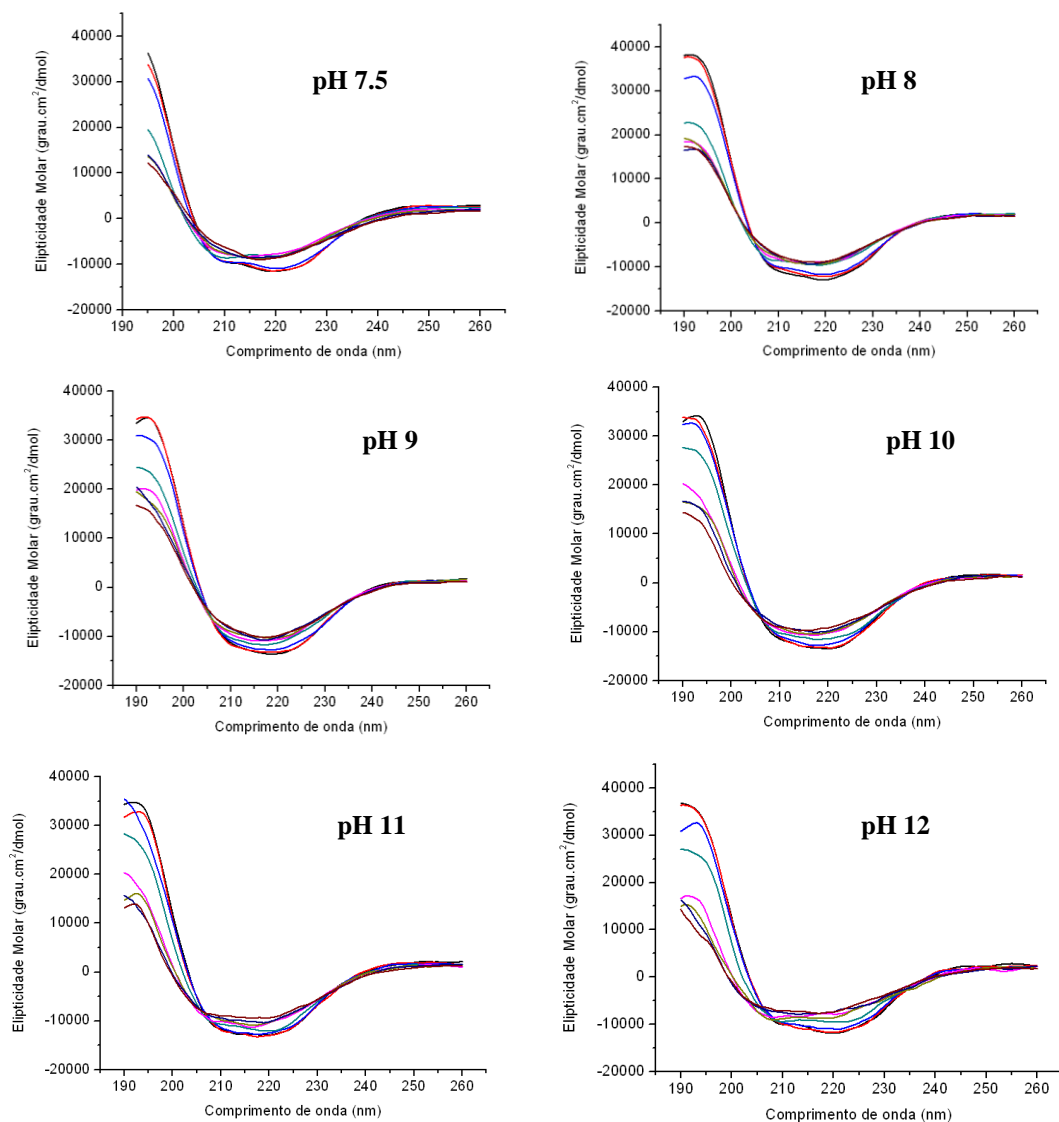
**Tabela 3.** Cálculo da porcentagem de estruturas secundárias do proteassoma 20S em diferentes pHs à temperatura ambiente (25°C), avaliadas pelo programa CD Spectra Deconvolution, nos espectros de 190 - 260 nm.

Porcentagem de Estruturas Secundárias em diferentes pHs à temperatura ambiente					
	$\alpha$ – hélices	Fitas $\beta$ Antiparalelas	Fitas $\beta$ Paralelas	Voltas $\beta$	Estruturas randômicas
pH 2	39,9 %	5,1 %	7,6 %	15,2 %	32,2 %
pH 3	36,8 %	5,7 %	7,5 %	15,1 %	34,9 %
pH 4	35,3 %	5,5 %	7,2 %	15,6 %	36,4 %
pH 5	37,0 %	4,9 %	7,1 %	15,2 %	35,8 %
pH 6	45,3 %	4,1 %	6,7 %	14,6 %	29,3 %
pH 7	44,1 %	4,2 %	6,9 %	14,1 %	30,7 %
pH 7.5	45,9 %	4,1 %	6,6 %	14,5 %	28,9 %
pH 8	44,5 %	4,3 %	6,9 %	14,7 %	29,6 %
pH 9	45,4 %	2,5 %	7,1 %	14,6 %	30,4 %
pH 10	45,8 %	2,8 %	7,3 %	14,2 %	29,9 %
pH 11	45,5 %	2,9 %	7,2 %	14,4 %	30,0 %
pH 12	44,5 %	2,8 %	7,4 %	14,5 %	30,8 %

O aumento da temperatura, em todos os pHs, não alterou a estrutura secundária do proteassoma, o que é observado pela pequena perda de elipticidade molar nos gráficos correspondentes a cada pH (figura 26). Em pH 3, houve uma diferença da elipticidade molar entre a temperatura de 25°C e as demais temperaturas, o que pode ser explicado pelo comportamento anômalo da curva de desnaturação nesse pH (figura 24 A), com perda abrupta do sinal dicróico de 25 a 30°C e manutenção do sinal até temperatura de 95°C. Nos pHs entre 5 - 12, observa-se alterações que correspondem à dissociação das subunidades, como foi mostrado na figura 24 B. Esses resultados mostram que o proteassoma 20S não sofre desnaturação total com a variação de pH e de temperaturas até 95°C. Apenas ocorre variação de elipticidade molar na temperatura próxima de 60°C (figura 24 B), com pequenas perdas de estruturas secundárias (figura 26), o que pode indicar a separação das

subunidades desse complexo nessa temperatura. Em pHs ácidos, o proteossoma apresenta maior estabilidade estrutural (figura 24 A), o que pode estar relacionado com a sua tendência de auto-associação nesses pHs, mostrada por espalhamento dinâmico de luz (figura 21 D) .



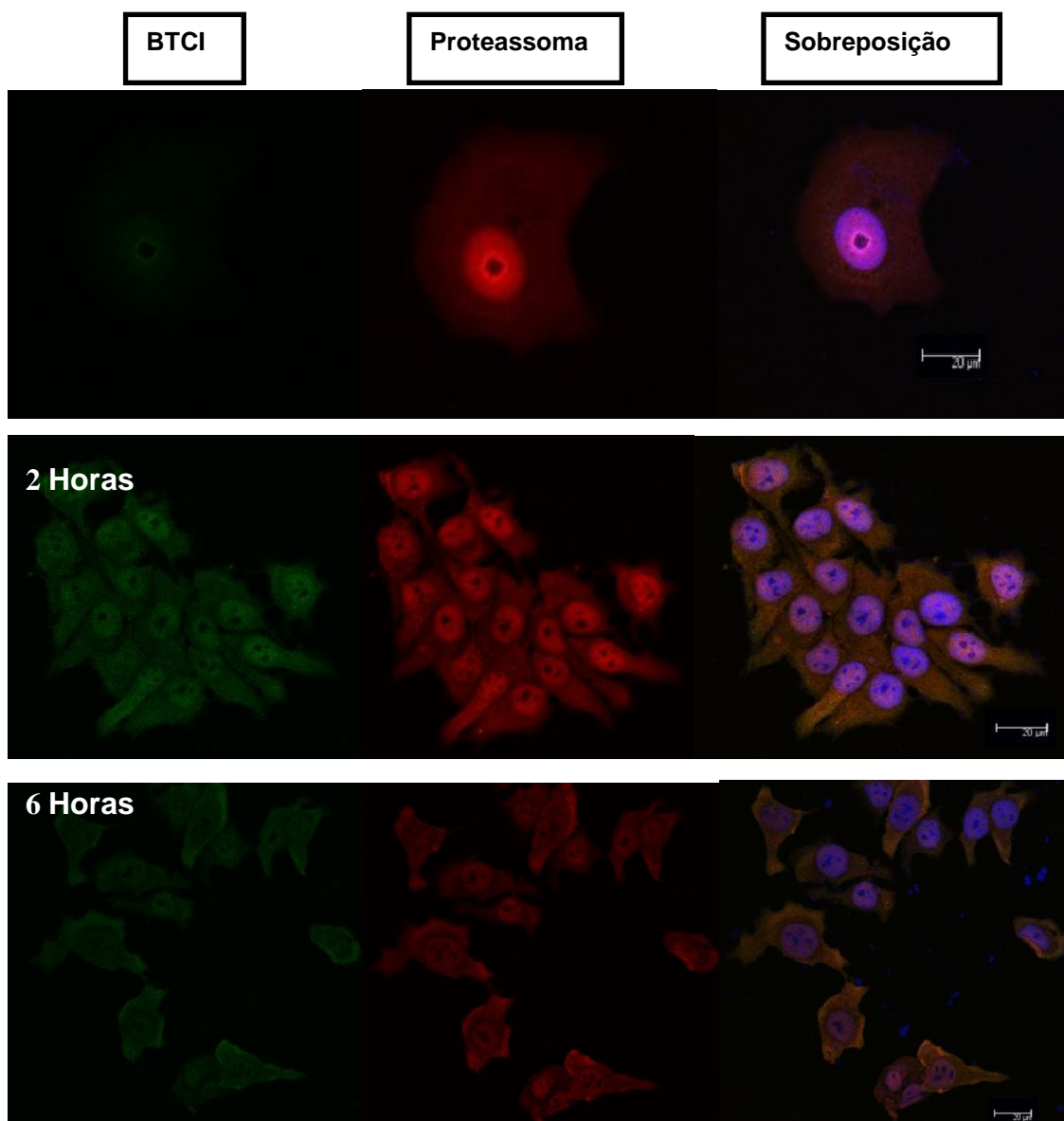


**Figura 26.** Espectros dicróicos do proteassoma 20S em diferentes pHs, com aumento da temperatura de 25 a 95°C. Os espectros mostram que em nenhum pH houve perda significativa de estrutura secundária com o aumento da temperatura. A temperatura de 25°C está apresentada em preto; a de 35°C, em vermelho; a de 45°C, em azul; a de 55°C, em verde; a de 65°C, em rosa; a de 75°C em dourado; a de 85°C em azul escuro e a de 95°C, em vinho.

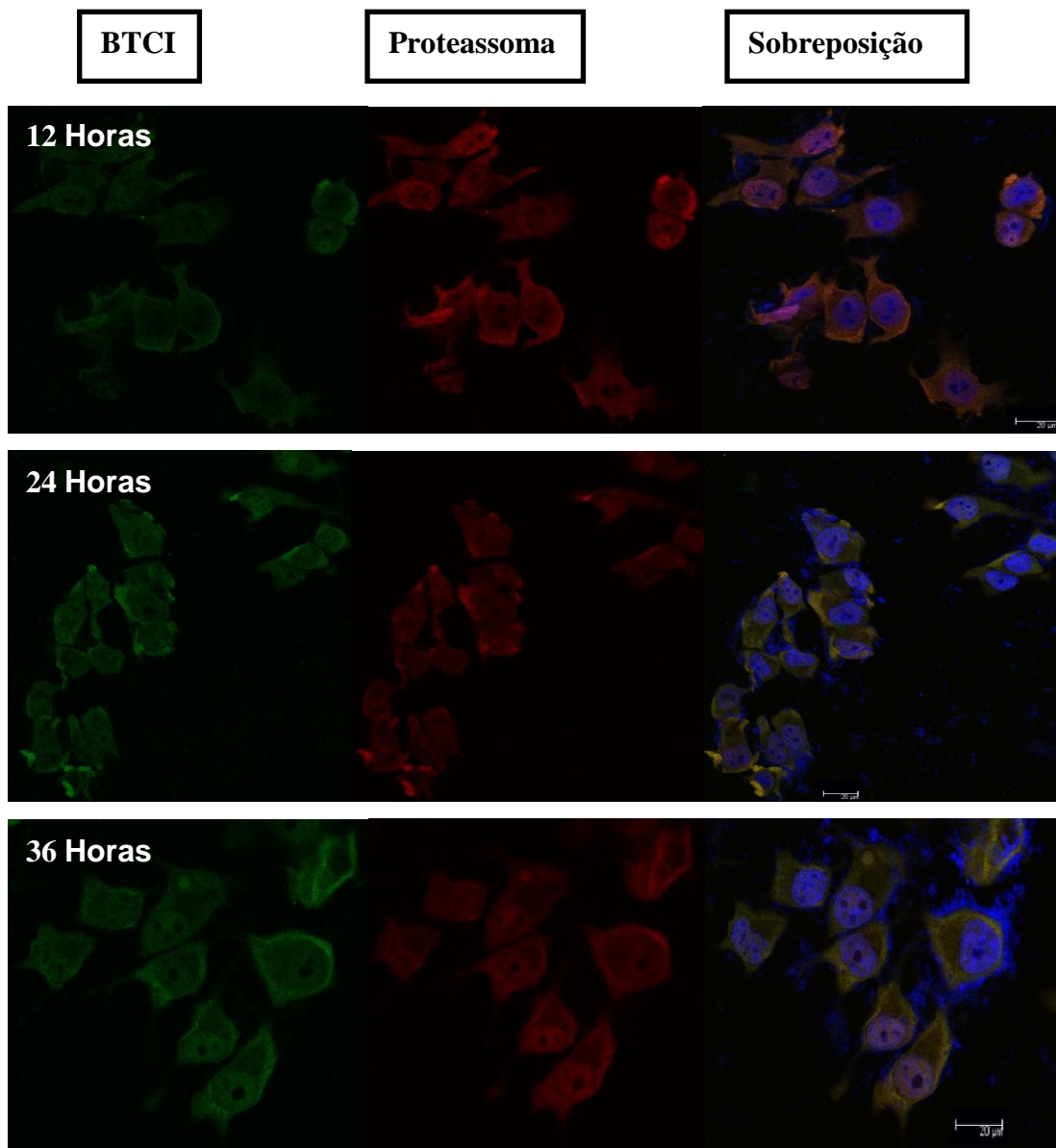
### 7.7 Imunocitocalização do BTCl e do proteassoma em células de câncer de mama MCF-7

Ensaios de citocalização do BTCl e do proteassoma foram realizados com marcação por anticorpo. As células MCF-7 foram tratadas com 200  $\mu$ M de BTCl por períodos variados. O controle negativo foi realizado com a ausência

do inibidor. A figura 27 mostra a localização do BTCl (verde) e do proteassoma (vermelho) nos tempos de incubação do inibidor de 2 a 36 horas. As duas moléculas estão colocalizadas no citoplasma e núcleo das células, como indicado pela coloração amarela, correspondendo à sobreposição da fluorescência verde (BTCl) e vermelha (proteassoma). Na ausência do inibidor (controle), não há sinal evidente de fluorescência verde, indicando que não houve marcação inespecífica do anticorpo marcado com esta coloração.





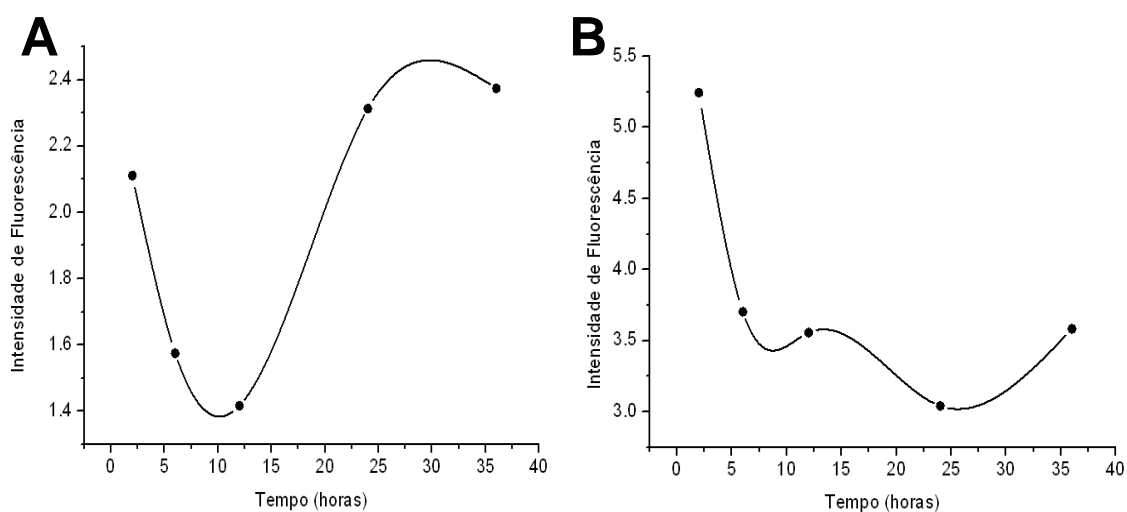


**Figura 27.** Análise de imunofluorescência do BTCl e proteassoma por microscopia confocal. Marcação do BTCl (verde) na primeira coluna, do proteassoma (vermelho) na segunda coluna e da colocalização dessas moléculas na terceira coluna com marcação para o DNA (azul). O experimento foi realizado com 2, 6, 12, 24 e 36 horas de incubação com BTCl. Pontos amarelos na terceira coluna indicam a colocalização do BTCl e do proteassoma, as quais são evidenciadas em todos os períodos. O controle negativo é representado na imagem com ausência de BTCl. A barra representa a medida de 20  $\mu\text{m}$ .

A quantificação da intensidade de fluorescência do BTCl, marcado pelo fluoróforo Alexa Flúor 488 (verde), e do proteassoma, marcado pelo Alexa Flúor 633 (vermelho), foi feita pelo programa ImageJ (figura 28). A

quantificação corresponde à média de intensidade de fluorescência de cada proteína marcada, das mesmas imagens apresentadas na figura 27.

A intensidade de fluorescência correspondente ao BTCl (figura 28 A) diminuiu até as primeiras 12 horas de incubação e aumentou a partir desse tempo. Isso sugere que o inibidor entra na célula MCF-7 (alta intensidade de fluorescência inicial, 2 horas de incubação) e depois é provavelmente metabolizado. A partir de 12 horas, a intensidade do sinal de fluorescência volta a aumentar, sugerindo a entrada novamente do inibidor na célula. A intensidade de fluorescência correspondente ao proteassoma (figura 28 B) até 12 horas diminuiu, o que pode sugerir a inibição desse complexo pelo BTCl, e, conseqüentemente sua degradação pelas células MCF-7. O aumento de intensidade de fluorescência correspondente ao proteassoma a partir de 24 horas pode ser devido ao aumento da expressão dos genes desse complexo proteolítico.



**Figura 28.** Quantificação da intensidade de fluorescência do BTCl (A) e do proteassoma (B), pelo programa ImageJ. A intensidade de fluorescência correspondente ao BTCl apresenta queda e posterior aumento, a partir de 12 horas de incubação, indicando entrada, provável metabolização e entrada novamente do inibidor na célula. O sinal de fluorescência correspondente ao proteassoma apresentou grande queda quando comparado com 2 horas de incubação de BTCl.

## 7.8 Efeito do BTCI e peptídeos derivados na ubiquitinação de proteínas

Ensaio de *Western Blotting* foi realizado com anticorpo anti-ubiquitina para avaliar o efeito do BTCI e de peptídeos derivados do BTCI (Pep1 e Pep 2) na ubiquitinação de proteínas em células MCF-7 (figura 29 A). O inibidor sintético de proteassoma, MG 132, foi utilizado como controle positivo e a ausência de inibidores representou o controle negativo.

Os resultados obtidos mostram que não houve aumento da ubiquitinação de proteínas celulares na presença de BTCI em 2 e 4 horas de incubação, quando comparado com o controle negativo (ausência de inibidores). Resultados semelhantes foram obtidos para o Pep1, o qual não causou alteração na ubiquitinação de proteínas. O Pep2 provocou, com 2 horas de incubação, diminuição das proteínas ubiquitinadas, mas esse efeito não foi mais observado com 4 horas de tratamento com o Pep2. Quando as células foram incubadas com MG 132, houve um aumento de proteínas celulares ubiquitinadas, o que era esperado, pois a inibição do proteassoma provoca o acúmulo de proteínas ubiquitinadas. Esse aumento ocorreu principalmente com 2 horas de incubação, indicando que a célula reverteu parte da degradação de proteínas após 4 horas de interação com inibidores de proteassoma.

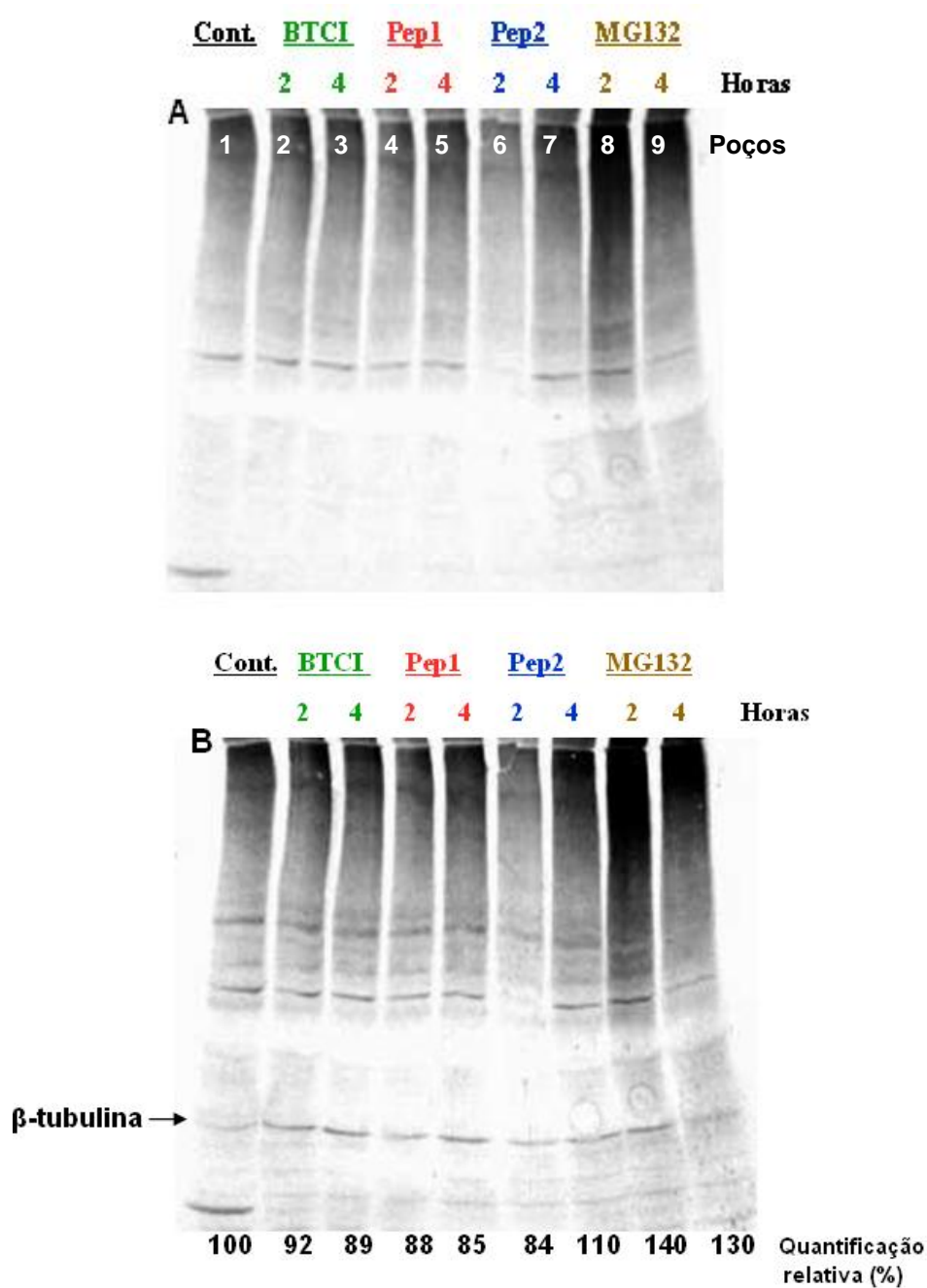
A perda de ubiquitinação de proteínas causada pelo Pep2 pode estar relacionada ao seu potencial de ativar a atividade quimotripsina-*like* do proteassoma na concentração utilizada, 400  $\mu$ M, como pôde ser observado no ensaio enzimático com esse peptídeo (figura 15 B). O aumento da atividade proteassomal pode explicar a diminuição de proteínas ubiquitinadas, as quais são marcadas para degradação pelo proteassoma 26S.

No ensaio, o controle da quantidade protéica colocada em cada poço foi obtido com a marcação das proteínas com um anticorpo anti- $\beta$ tubulina, visto que a  $\beta$ -tubulina é uma proteína constitutiva da célula (figura 29 B). Esse controle é importante para mostrar que os efeitos de aumento ou diminuição de proteínas marcadas não são decorrentes de concentrações diferenciadas de proteínas totais em cada poço. Em todos os poços a marcação para  $\beta$ -tubulina foi de intensidades similares.

Para quantificar as intensidades de marcação da fosfatase alcalina para proteínas ubiquitinadas, foi realizada a quantificação dos *pixels* em cada poço

pelo programa ImageJ (figura 29 B). A quantificação realizada foi relativa em relação à intensidade das bandas correspondentes à  $\beta$ -tubulina em cada poço. Considerando o controle negativo como 100%, observamos que não há aumento da ubiquitinação de proteínas nas células tratadas com o BTCl e com o peptídeo Pep1. Ocorre uma diminuição mínima da ubiquitinação na presença do BTCl e do Pep1. Já o Pep2, com 2 horas de incubação, causa diminuição da ubiquitinação (em 16%) e depois, um aumento dessa marcação com 4 horas (aumento de 10%).

O MG132, como esperado, apresenta um considerável aumento de ubiquitinação com 2 horas de incubação (aumento de 40%).

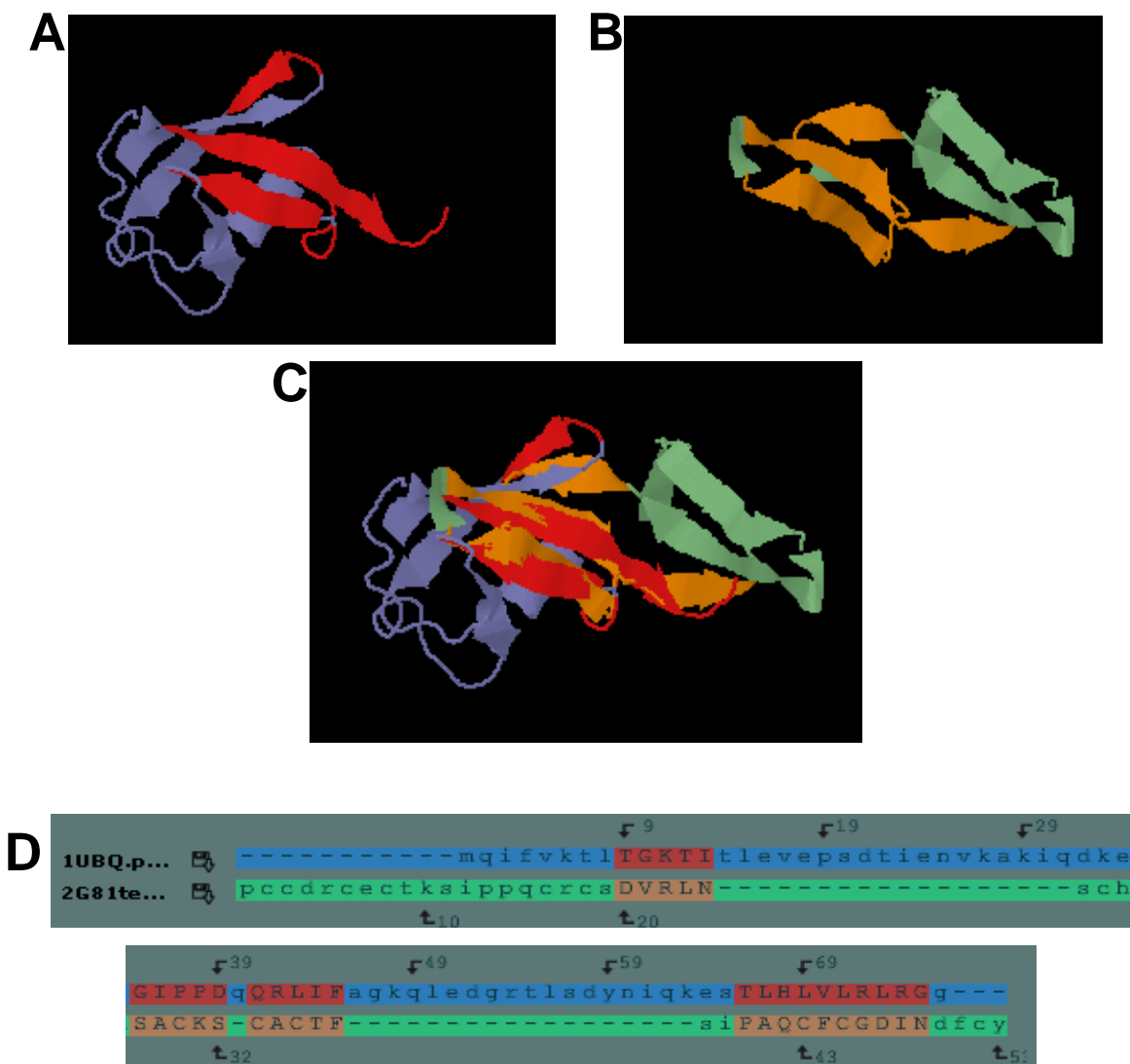


**Figura 29.** Efeito do BTCl e peptídeos derivados na ubiquitinação de proteínas de células MCF-7. As células foram tratadas com BTCl (200  $\mu$ M - verde), Pep1 (400  $\mu$ M - vermelho), Pep2 (400  $\mu$ M - azul) e MG 132 (10  $\mu$ M - marrom). Controle sem inibidores (poço 1), 2 horas (poço 2) e 4 horas (poço 3) de incubação com o BTCl; 2 horas (poço 4) e 4 horas (poço 5), de incubação com o Pep1; 2 horas (poço 6) e 4 horas (poço 7), com o Pep2. Efeito do MG 132 com 2 horas (poço 8) e 4 horas (poço 9) (A). Controle positivo da quantidade de proteínas totais em cada poço, com a marcação de um anticorpo para  $\beta$ -tubulina (seta), uma proteína do citoesqueleto, constitutiva (B). A quantificação relativa (em relação à  $\beta$ -tubulina) da marcação da fosfatase alcalina em cada poço foi realizada pelo programa ImageJ, considerando o controle negativo como 100%.

O aumento da ubiquitinação de proteínas em células tratadas com BTCl era esperado, visto que nesse trabalho, foi mostrado que o BTCl apresenta atividade inibitória para as três atividades proteolíticas do proteassoma. Entretanto, esse efeito não foi observado no ensaio de *Western Blotting* (figura 29). Isso pode indicar que o BTCl não só está envolvido na via de degradação direta pelo proteassoma, mas também em outras vias moleculares, como exemplo, a via de ligação da ubiquitina no substrato, mediada pelas enzimas E1 (ativadora), E2 (conjugadora) e E3 (ligase).

Para analisar se o BTCl poderia estar competindo com essas proteínas pela ligação da ubiquitina, foi realizado um estudo estrutural de comparação das estruturas terciárias do BTCl e ubiquitina, visando caracterizar as semelhanças ou diferenças estruturais que pudessem explicar tais resultados. A sobreposição da estrutura terciária do BTCl com a da ubiquitina (figura 30) foi realizada utilizando o programa Top Match, um serviço de alinhamento e sobreposição de estruturas de proteínas, disponível gratuitamente na internet pelo site: <http://topmatch.services.came.sbg.ac.at/>.

O BTCl apresenta similaridade estrutural com a ubiquitina de 39% (root-mean-square error, RMSE = 2,7 Å), principalmente entre a região C-terminal da ubiquitina e a região C-terminal do BTCl (região de inibição da quimotripsina) (figura 30 D). Isso pode indicar que o inibidor pode estar competindo com a ubiquitina pelo sítio de reconhecimento desta pelas proteínas E1, E2 e/ou E3 ligase (a ubiquitina se liga a essa proteínas pelo C-terminal). Ao impedir que a ubiquitina entre na via de marcação do substrato, ocorre uma diminuição da ubiquitinação de proteínas, mesmo que o proteassoma esteja inibido, o que pode explicar a ausência do aumento de proteínas ubiquitinadas em células tratadas com o BTCl.



**Figura 30.** Análise da sobreposição estrutural do BTCl com a Ubiquitina usando o servidor Top Match. Sobreposição da estrutura terciária da ubiquitina (roxo e vermelho) (A) com o BTCl (verde e laranja) (B) evidenciando os sítios de maior similaridade estrutural (laranja e vermelho) (C). A estrutura primária também foi analisada (D), onde estão mostrados os aminoácidos que compõe os sítios de similaridade estrutural da ubiquitina (1ª linha) e do BTCl (2ª linha).

O peptídeo Pep1 corresponde à região C-terminal do BTCl, na qual está localizado o sítio reativo para a quimotripsina. Esse peptídeo apresentou resultado semelhante ao do BTCl na ubiquitinação de proteínas (figura 29), indicando que essa é a região que provavelmente está envolvida nos efeitos moleculares do BTCl nos ensaios de ubiquitinação aqui referenciados. Adicionalmente, efeitos citostáticos e citotóxicos semelhantes para o BTCl e o Pep1 em células MCF-7 foram demonstrados por Joanitti, 2008.

## 8. DISCUSSÃO

O BTCI é um inibidor de serinoproteases (9 kDa) isolado de sementes de *Vigna unguiculata* (Ventura *et al.*, 1966) e inibe a tripsina e a quimotripsina formando complexos estáveis (Ventura *et al.*, 1975). Os estudos com esse inibidor iniciaram-se há mais de trinta e cinco anos, com caracterizações físico-químicas, bioquímicas e biofísicas e, recentemente, as propriedades anticarcinogênicas desse inibidor em células de câncer de mama foram relatadas (Joanitti *et al.*, 2010). Apesar do número expressivo de trabalhos desenvolvidos com esse inibidor, nas áreas citadas, nenhum estudo foi realizado com o BTCI em vias moleculares relacionadas ao câncer de mama e interações com outras proteínas (além da tripsina e quimotripsina).

O presente trabalho mostrou que o BTCI é um novo inibidor natural do proteassoma 20S. O inibidor apresentou alta afinidade inibitória pelas três atividades catalíticas do proteassoma, com constantes de inibição de  $7,0 \times 10^{-7}$  M para a atividade quimotripsina-*like*,  $1,0 \times 10^{-7}$  M para a atividade tripsina-*like* e  $1,4 \times 10^{-6}$  M para a atividade caspase-*like* (figura 14). Esses resultados estão de acordo com os valores das constantes de inibição na ordem de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  M, calculados para a maioria dos inibidores do tipo Bowman-Birk (Ikenaka e Norioka, 1986).

Os resultados de inibição das atividades quimotripsina-*like* e tripsina-*like* do proteassoma 20S foram semelhantes aos valores correspondentes à atividade inibitória do BTCI contra as enzimas quimotripsina e tripsina (Ventura *et al.*, 1975; Fachetti *et al.*, 1984; Freitas *et al.*, 1999). Além disso, o BTCI apresentou forte inibição contra caspase-*like*, o que provavelmente pode ser explicado por uma inibição estérica do inibidor ao atingir o sítio ativo do complexo enzimático. Essa conclusão é suportada pelos resultados encontrados para a atividade inibitória dos peptídeos derivados de BTCI (Pep1 e Pep2) que inibem o sítio da quimotripsina e tripsina, respectivamente, e não apresentaram inibição significativa contra o sítio de caspase-*like* (figura 15). Nesse caso, o BTCI deve ocupar o canal central do proteassoma 20S (de aproximadamente 1Å), próximo ao sítio ativo do complexo enzimático, inibindo



as três atividades proteásicas do proteassoma, com maior afinidade pela tripsina-*like* (figura 14).

O BTCI foi o primeiro membro da família Bowman-Birk a ser caracterizado como potente inibidor das três atividades proteásicas do proteassoma. Até a presente data, somente o trabalho de Chen e colaboradores (2005) reportou sobre a atividade inibitória de um inibidor Bowman-Birk (BBI) contra o proteassoma 26S. Nesse estudo foi mostrado que 40  $\mu\text{M}$  do BBI inibe apenas a atividade quimotripsina-*like* (70% de inibição) do proteassoma 26S *in vitro*. Em contraste, o BTCI inibiu aproximadamente 100% as três atividades enzimáticas do proteassoma 20S, com concentração média de 20  $\mu\text{M}$ . Isso indica que as diferenças na estrutura primária e terciária do BTCI, em comparação ao BBI, são fundamentais para a inibição dos três sítios ativos do proteassoma. Portanto, os resultados aqui apresentados mostram que o BTCI é um novo inibidor natural das três atividades catalíticas do proteassoma 20S.

O Pep1 (peptídeo que inibe apenas a quimotripsina) inibiu 80% da atividade quimotripsina-*like*, 60% da atividade tripsina-*like* e 25% da atividade caspase-*like* do proteassoma 20S. O Pep2 (peptídeo que inibe apenas a tripsina) não inibiu a atividade caspase-*like*, mas inibiu aproximadamente 75% da atividade tripsina-*like*. Em concentrações até 400  $\mu\text{M}$  esse peptídeo ativou a quimotripsina-*like*, com posterior inibição dessa atividade em até 50%, em concentrações maiores. Quando os dois peptídeos foram utilizados no ensaio enzimático, em uma mesma solução, a inibição da atividade quimotripsina-*like* foi de 80%. Em concentrações abaixo de 200  $\mu\text{M}$  não ocorreu inibição da atividade caspase-*like*, mas acima dessa concentração, ocorreu aumento dessa atividade, em 1,5 vezes. Em concentrações menores que 800  $\mu\text{M}$  houve aumento de mais de 3 vezes da atividade de tripsina-*like* e em concentrações maiores, ocorreu inibição dessa atividade em até 90% (figura 15).

Essa mesma característica de inibição específica e, concomitante ativação de outras atividades enzimáticas desse complexo macromolecular, foi reportada recentemente (Groll *et al.*, 2006). Nesse trabalho utilizou-se o dipeptídeo sintético Bortezomibe, um inibidor do proteassoma, que tem sido utilizado em testes clínicos no tratamento de mieloma múltiplo e linfoma não-Hodgkin (NHL). Esse peptídeo inibe a atividade de quimotripsina e caspase-*like*

do proteassoma, mas, concomitantemente, aumenta a atividade tripsina-*like* do proteassoma. Isso pode estar relacionado a mudanças estruturais causadas pelo peptídeo em região catalítica ou não da molécula, o que causa a inibição de um determinado sítio, mas expõe outro sítio, facilitando sua interação com o substrato.

Kisselev e colaboradores (2002) mostraram que peptídeos hidrofóbicos (alvos da atividade quimotripsina-*like*) podem estimular a hidrólise de substratos por meio da abertura do canal do proteassoma nos anéis  $\alpha$ . Esse estímulo pode estar relacionado com a ligação desses peptídeos em sítios não catalíticos do complexo, o que causaria mudanças estruturais na molécula, levando à ativação da hidrólise do proteassoma. O aumento da atividade catalítica do proteassoma por peptídeos hidrofóbicos pode estar relacionado com eventos fisiológicos importantes, onde o próprio substrato serviria como um estímulo para a quebra do mesmo, otimizando a atividade de degradação protéica na célula.

Outros trabalhos na literatura mostram proteínas que ativam um sítio do proteassoma e, ao mesmo tempo, inibem outro. O ativador PA28 (complexo 11S) em mamíferos, e seu homólogo em *Drosophila*, ativa fortemente a atividade tripsina-*like* e inibe a atividade quimotripsina-*like* do proteassoma 20S, mostrando que ele é um regulador positivo e negativo desse complexo proteolítico (Masson *et al.*, 2001). Esse efeito também foi observado no presente trabalho, quando a atividade do proteassoma 20S foi avaliada na presença dos dois peptídeos simultaneamente, Pep1 e Pep2 (figura 15 C).

A figura 15 C mostra a ativação de mais de três vezes da atividade tripsina-*like* do proteassoma na presença do Pep1 e do Pep2. O efeito do Pep2, no aumento da atividade quimotripsina-*like* (figura 15 B), ocorre em consequência provável da exposição do sítio da quimotripsina no proteassoma. Essa interação, na presença do Pep1, pode ter ocasionado mudanças conformacionais, resultando no aumento de outra atividade proteolítica, a tripsina-*like* (figura 15 C). Os dados aqui apresentados indicam que o peptídeo hidrofóbico Pep1 e hidrofílico Pep2, assim como o BTCl, podem interagir de diversas formas com o proteassoma, tanto em regiões catalíticas, como não catalíticas, resultando em efeitos complexos.

Ensaio de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) mostraram que o BTCl interage com o proteassoma 20S. O BTCl formou complexo estável com o proteassoma a partir de 45 minutos de incubação, causando mudança estrutural no complexo, indicado pelo discreto aumento do diâmetro hidrodinâmico do complexo em relação ao proteassoma livre (figura 19).

O proteassoma 20S apresentou-se na forma monomérica, com diâmetro hidrodinâmico de 15 nm, corroborando os dados apresentados na literatura (Kopp *et al.*, 1986; Yoshimura *et al.*, 1993).

O BTCl não foi observado na forma monomérica nas diferentes concentrações analisadas, mas sim nas formas diméricas e triméricas, com agregados a partir da concentração de 60 µM. Esses resultados estão de acordo com a tendência de formação de oligômeros e agregados desse inibidor, devido à exposição de resíduos hidrofóbicos ao solvente (Ventura *et al.*, 1981; Silva *et al.*, 2005).

A técnica de EDL tem sido correntemente utilizada principalmente para analisar estágios mono ou polidispersos de proteínas para fins de cristalização (Baldwin *et al.*, 1986). Estudo de associação de proteínas com surfactantes (Tardioli *et al.*, 2010), nanopartículas de ouro (Lacerda *et al.*, 2010), nanopartículas de poliestireno sulfonado (Liang *et al.*, 2004), quitosana (Chen e Tianqing, 2008), entre outros, tem sido realizados utilizando o EDL. No entanto, atualmente existem poucos trabalhos publicados relatando a associação de duas proteínas com o uso dessa metodologia. Ao realizar uma busca na literatura científica, poucos trabalhos foram encontrados mostrando a associação entre duas proteínas, como é o caso do trabalho de Libich e colaboradores (2003), que mostrou a interação entre a mielina e calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  utilizando o EDL.

O presente trabalho mostrou, além da associação do BTCl com o proteassoma, a estabilidade do complexo formado entre os mesmos. O complexo BTCl-proteassoma 20S apresentou termoestabilidade até 55°C (figura 20). A 60°C ocorreu a dissociação do complexo, o que pode ter sido facilitado pela separação das subunidades do proteassoma 20S, indicada pelas curvas de desnaturação térmica analisadas por dicroísmo circular, as quais mostram a perda de elipticidade molar desse complexo nessa temperatura,

sem, no entanto, chegar à zero, o que indicaria desnaturação da molécula (figura 24).

Além de apresentar termoestabilidade, o complexo apresentou estabilidade em pHs neutros e básicos (pH 6 a 12), e em pHs ácidos (pH 2 e 4), predominou a agregação das proteínas (figura 21). Isso confirma a tendência de agregação do BTCl e do proteassoma 20S em pHs ácidos. Esse efeito foi também evidenciado por EDL para essas moléculas separadamente (figura 21 C e D), e por dicróismo circular, onde o proteassoma 20S apresentou manutenção ou ganho de elipticidade molar com o aumento da temperatura, em pHs ácidos (figura 24 A).

Esses resultados estão de acordo com os dados previamente reportados para o BTCl, o qual é termoestável e estável em ampla faixa de pH, preservando 96% de sua atividade inibitória depois de 60 minutos de aquecimento à 95°C e apresentando atividade estável entre pH 3 e pH 10 (Silva *et al.*, 2001).

O proteassoma 20S apresenta estrutura conservada entre fungos e humanos (Lupas *et al.*, 1993). As características físicoquímicas, como coeficiente de sedimentação, coeficiente de difusão, espectro dicróico e composição de aminoácidos são similares em proteassomas de eucariotos (Tanaka *et al.*, 1988). O trabalho de Thomas e colaboradores (2002) mostra que o proteassoma 20S de músculo esquelético de avestruz apresenta estabilidade de pH entre 5 e 12 e termoestabilidade até 60°C. Esse estudo está de acordo com os resultados apresentados na presente dissertação, onde o proteassoma apresentou estabilidade em pH 6 a 12, com agregações em pHs ácidos, e estabilidade com temperaturas até 60°C, onde a partir disso, ocorre provavelmente a dissociação dos anéis do proteassoma 20S (figura 24).

Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que o NaCl, a partir de 2 mM, desestabiliza o complexo BTCl-proteassoma 20S, que parece ser sensível a mudanças da força iônica causando mudanças conformacionais na estrutura do complexo ou do proteassoma isoladamente (figura 22).

Embora o organismo humano contenha em média 150 mM de sal, além do sódio e do cloreto, existem diversos outros íons na célula. A localização e a interação com outras moléculas celulares podem evitar o contato direto do proteassoma com o Na<sup>+</sup> e o Cl<sup>-</sup> em maior concentração, visto que estes íons

desestabilizam a estrutura macromolecular desse complexo (figura 22). Entretanto, há proteassomas que toleram altas concentrações de sal, como o proteassoma 20S da arqueia *Haloferax volcanii*, que tolera concentrações de até 2 M de NaCl e não realiza proteólise na ausência de sal. Esse proteassoma, porém, apresenta mudanças na estrutura primária (predominância de aminoácidos ácidos) quando comparado com proteassomas 20S conservados de eucariotos (Wilson *et al.*, 1999).

Os estudos *in vitro* realizados neste trabalho objetivaram a investigação da interação do BTCl e do proteassoma em células de câncer de mama MCF-7 e efeitos moleculares dessa interação relacionados com a ubiquitinação de proteínas celulares. Os resultados mostraram que o BTCl interage com o proteassoma em células MCF-7 a partir de 2 horas de incubação dessas células com o inibidor.

O BTCl, marcado com anticorpo fluorescente, foi observado no citoplasma e no núcleo dessas células, com intensidade decrescente até 12 horas de incubação e posterior aumento da intensidade de fluorescência após 24 de tratamento com o inibidor. Isso indica que o BTCl entra na célula em 2 horas e depois é provavelmente metabolizado pela mesma, considerando-se a diminuição da intensidade de fluorescência do inibidor. Sabe-se que outro inibidor Bowman-Birk, o BBI, é metabolizado pelo corpo humano após 6 horas de ingestão, encontrando-se na forma reduzida e não detectado pelo anticorpo de sua forma nativa (Wan *et al.*, 2000). Caso o BTCl também seja reduzido pela célula a partir de 6 horas de incubação, o anticorpo anti-BTCl não mais o reconheceria, o que pode explicar a diminuição da marcação para este inibidor a partir de 6 horas. Todavia, o BTCl aparentemente fragiliza a célula após 24 horas, permitindo a maior entrada desse inibidor, o que é indicado pelo aumento da intensidade de fluorescência apresentada na figura 28. O efeito que o BTCl apresenta em células MCF-7 a partir de 24 horas é observado em mudanças morfológicas nessas células (dado não mostrado), o que pode estar relacionado com seu efeito anticarcinogênico, o qual leva células de câncer de mama à morte a partir de 72 horas de incubação (Joanitti *et al.*, 2010).

A interação do BTCl com o proteassoma é indicada pela sobreposição da fluorescência de ambas as proteínas, resultando na coloração amarelada, que corresponde à sobreposição da fluorescência verde do BTCl com a

fluorescência vermelha do proteassoma. A imunocitocalização dessas moléculas mostra que o BTCI interage com o proteassoma no citoplasma e no núcleo da célula, provavelmente, causando a inibição desse complexo *in vitro*, da mesma forma como demonstrado em ensaio enzimático isolado (figura 14).

A intensidade de fluorescência do proteassoma é reduzida a partir de 6 horas de incubação com o BTCI. A redução dessa intensidade de fluorescência pode estar relacionada com a degradação de subunidades do proteassoma, em resposta a inibição de suas atividades, causada pelo BTCI. O aumento da intensidade de fluorescência do proteassoma a partir de 24 horas de incubação com o inibidor pode indicar a tentativa da célula de repor as subunidades inibidas. Essa hipótese já foi levantada considerando a resposta de células sanguíneas cancerosas ao inibidor de proteassoma Bortezomibe. Esse inibidor induziu o aumento da expressão de subunidades proteassomais, principalmente das subunidades catalíticas (Rückrich *et al.*, 2009).

Os estudos realizados em células de câncer de mama também mostraram que o BTCI não induz o aumento de proteínas ubiquitinadas nessas células (figura 29), ao contrário do que era esperado. O proteassoma 20S, quando associado com dois complexos regulatórios denominados PA700 ou 19S, forma o proteassoma 26S. Este reconhece proteínas ubiquitinadas e as degrada em uma via dependente de ATP (Glickman *et al.*, 1998; Voges *et al.*, 1999; Pickart e Cohen 2004). Portanto, a inibição do proteassoma leva à diminuição ou ausência da degradação de proteínas ubiquitinadas, ocasionando o acúmulo das mesmas.

O BTCI, assim como o Pep1 (inibidor da quimotripsina derivado do BTCI), apresentaram efeitos semelhantes, causando ligeira diminuição da ubiquitinação de proteínas celulares, em células MCF-7. No entanto, o Pep2 (inibidor da tripsina derivado do BTCI) apresentou diminuição de proteínas ubiquitinadas em células MCF-7 com 2 horas de tratamento, efeito que não foi mais evidenciado a partir de 4 horas de incubação, indicado pelo aumento da ubiquitinação após esse período.

Como o BTCI apresenta alta similaridade estrutural com a ubiquitina, principalmente na região C-terminal das moléculas (figura 30), esse inibidor pode estar competindo com a ubiquitina pela ligação em proteínas E1, E2 ou E3 da via de ligação da ubiquitina às proteínas alvo, marcadas para

degradação. A região C-terminal da ubiquitina é a região reconhecida e ligada nas enzimas E1 ativadora, E2 conjugadora e E3 ligase.

Considerando as semelhanças estruturais citadas acima, essas enzimas podem estar reconhecendo preferencialmente o BTCI, em comparação com a ubiquitina, o que estaria impedindo a marcação de proteínas alvo, e, conseqüentemente, não ocorrendo o acúmulo de proteínas ubiquitinadas. A região C-terminal do BTCI contém a alça de reatividade contra a quimotripsina. Estudos na literatura já demonstraram que a atividade contra a quimotripsina é a responsável pelo efeito anticarcinogênico de inibidores da família Bowman-Birk (Yavelow *et al.*, 1985). Caso a interação com as enzimas E1, E2 e/ou E3 esteja relacionada com efeitos anticarcinogênicos, a competição de inibidores Bowman-Birk pela ligação com a ubiquitina (devido a sua similaridade estrutural na região C-terminal) pode explicar a importância da região C-terminal do BTCI (o qual inibe a quimotripsina) no seu efeito anticarcinogênico previamente demonstrado (Joanitti *et al.*, 2010).

O inibidor de proteassoma Bortezomibe, utilizado no tratamento de mieloma múltiplo e linfoma não-Hodgkin (NHL) (Adams, 2004), é capaz de inibir a ubiquitinação de alguns substratos celulares, como histonas, por meio da inibição de proteínas ubiquitina conjugadoras E2 (Xu *et al.*, 2004). O Bortezomibe apresenta diversos efeitos moleculares como: a parada do ciclo celular na fase G2/S (Mortenson *et al.*, 2004), a estabilização de proteínas regulatórias do ciclo celular, a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B, indução de apoptose, entre outros (Adams *et al.*, 1999; Adams, 2004), envolvendo principalmente a inibição da subunidade  $\beta$ 5 (atividade quimotripsina-*like*) do proteassoma (Crawford *et al.*, 2006). O efeito desse inibidor em células de câncer de mama também vem sendo estudado (Orlowski e Dees, 2003; Cardoso *et al.*, 2004). Isso mostra que inibidores de proteassoma também podem estar associados com a inibição da ubiquitinação.

Recentemente, diversos trabalhos na literatura vêm relatando a associação entre inibidores da via ubiquitina-proteassoma e o câncer de mama. Agyin e colaboradores (2009) mostraram que um novo inibidor sintético da atividade quimotripsina-*like* do proteassoma 20S, o BU-32, apresenta atividade antitumoral em células de câncer de mama. O BU-32 induziu o acúmulo de inibidores de CDKs (quinases dependentes de ciclina) p21 e p27; do gene

supressor de tumor p53 e de proteínas pró-apoptóticas como Bid (proteína contendo o domínio BH3) e Bax (proteína X associada a Bcl-2) em células MCF-7. Outro inibidor sintético do proteassoma, o Z-LLNle-CHO, derivado do inibidor de proteassoma MG-132, inibe a atividade quimotripsina-*like* do proteassoma, sendo essa inibição responsável pelo efeito citotóxico desse inibidor em células de câncer de mama (Han *et al.*, 2009). O Z-LLNle-CHO apresentou efeitos de parada do ciclo celular na fase G2/M e de regulação de proteínas relacionadas à apoptose.

O inibidor BTCI vem sendo estudado como um candidato promissor na prevenção e supressão da carcinogênese, envolvendo efeitos citostáticos e citotóxicos em células de câncer de mama. O BTCI, assim como os inibidores relatados acima, apresentou efeitos inibitórios do ciclo celular na fase G2/S em células MCF-7 (Joanitti *et al.*, 2010) e inibiu fortemente as três atividades do proteassoma 20S.

Como mostrado acima, inibidores de proteassoma com efeitos anticarcinogênicos apresentam inibição principalmente da atividade quimotripsina-*like*, o que corrobora com o resultado de que apenas o Pep1, peptídeo derivado do BTCI, com alça reativa contra a quimotripsina, apresenta efeitos anticarcinogênicos, como o BTCI (Joanitti, 2008). Esse é um indício de que a principal atividade envolvida nos efeitos antitumorais é a atividade de quimotripsina. Como mostrado nesse trabalho, essa atividade pode estar também relacionada com a interação de proteínas que se ligam à ubiquitina (E3 ligase, por exemplo), visto que a região do BTCI que inibe a quimotripsina (Pep1) é estruturalmente similar à região de ligação à ubiquitina (figura 30).

Diversos trabalhos na literatura mostram a relação entre proteínas ubiquitina E3 ligases e o câncer de mama. A proteína Mdm2 (Murine double minute 2) é uma E3 ubiquitina ligase, a qual interage principalmente com a proteína p53, promovendo sua ubiquitinação e posterior degradação pelo proteassoma 26S (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). A proteína p53 regula o ciclo celular por meio da ativação da transcrição de genes que controlam a progressão do ciclo e a manutenção da integridade genômica, levando à parada do ciclo e até mesmo à apoptose (Donehower e Bradley, 1993; Livingstone *et al.*, 1992; Vogelstein e Kinzler, 1992).



Em glândulas mamárias, elevados níveis de Mdm2 inibem o desenvolvimento e a diferenciação normal da mama, com várias células multinucleadas e poliplóides, fenótipos comuns de células com p53 inativada (Lundgren *et al.*, 1997). Isso indica que a superexpressão de Mdm2 está diretamente relacionada com o desenvolvimento de tumores, incluindo o câncer de mama (Courjal *et al.*, 1996; Cuny *et al.*, 2000; Fontana *et al.*, 1994; Marchetti *et al.*, 1995; McCann *et al.*, 1995; Quesnel *et al.*, 1994) e com o prognóstico ruim de vários cânceres humanos. Essa superexpressão está relacionada à inativação de p53, o que indica que inibidores de Mdm2 podem reativar a p53 e induzir a parada do ciclo celular e a apoptose. Em células MCF-7, contendo p53 nativa (não mutada), agentes quimioterápicos que induzem o aumento dos níveis de p53 não foram tão efetivos devido à superexpressão de Mdm2 (Wang *et al.*, 2001).

A enzima Skp2 (proteína associada à quinase na fase S - 2) pertence à família de proteínas F-box, que constitui uma das quatro subunidades do complexo de ubiquitina E3 ligase chamado SCF (Feldman *et al.*, 1997; Skowyra *et al.*, 1997). Skp2 reconhece a proteína p27 (inibidora do complexo ciclina-CDK) em uma via dependente de fosforilação (Carrano *et al.*, 1999). A p27 regula a progressão da fase G1 para S, por meio da inibição do complexo ciclina E/CDK-2. Enquanto a p27 é altamente expressada em tecido epitelial da mama normal, a diminuição do nível da proteína p27 em câncer de mama primário está relacionada a um prognóstico ruim (Cariou *et al.*, 2000; Catzavelos *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997).

Skp2 é superexpressada em vários de tumores humanos, incluindo o câncer de mama, e a expressão de Skp2 é inversamente correlacionada com a de p27, o que leva a desregulação no ciclo celular (Gstaiger *et al.*, 2001; Signoretti *et al.*, 2002). A regulação do inibidor de CDK, p27, não é controlada no nível transcricional, mas sim via degradação proteolítica após ubiquitinação, iniciada pela E3 ligase Skp2 (Traub *et al.*, 2006). Em células MCF-7, estrógenos causam a superexpressão de Skp2 (Foster *et al.*, 2003).

Considerando a importância dessa via de regulação do ciclo celular envolvendo as proteínas acima relacionadas, a investigação de inibidores de proteínas, principalmente as do tipo “E3” é fundamental para o tratamento do câncer de mama. Vale ressaltar que várias ubiquitina E3 ligases estão

associadas com a regulação negativa (marcação para degradação) de proteínas chave no controle do ciclo celular.

Outra E3 ligase bastante relatada na literatura, envolvida no câncer de mama é a proteína BRCA1. A atividade de ubiquitina ligase (E3) da BRCA1 é, até então, a única atividade bioquímica relatada para essa proteína (Lorick *et al.*, 1999; Ruffner *et al.*, 2001). O gene *BRCA1* (câncer de mama 1, início precoce) é um importante supressor de tumor. Mutações nesse gene em células germinativas estão presentes em aproximadamente 50% dos casos de câncer de mama herdados, e a aquisição de um único alelo defeituoso leva à predisposição tanto do câncer de ovário, quanto do câncer de mama (King *et al.*, 2003).

Células com mutação no gene *BRCA1* exibem elevados níveis de cromossomos aberrantes, com quebras no DNA e mudanças na cromatina; aumento de sensibilidade a agentes que danificam o DNA e defeitos nas funções de checagem do ciclo celular (Venkitaraman, 2002). A proteína BRCA1 é necessária também para a parada do ciclo celular nas fases S e G2/M, após danos no DNA (Xu *et al.*, 2001). A proteína de interação com BRCA1 mais importante é a BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1) e essa associação é requerida para a função de E3 ligase da BRCA1 (Lorick *et al.*, 1999; Ruffner *et al.*, 2001). Nas células, a maioria das proteínas BRCA1 é encontrada associada com BARD1, sugerindo que essas proteínas funcionam juntas em um complexo heterodímero (Boulton *et al.*, 2004).

Todos esses dados apresentados mostram que proteínas E3 ligases podem estar envolvidas no desenvolvimento de tumores quando são superexpressadas (no caso de Mdm2 e Skp2) ou inativadas (no caso de BRCA1). Portanto, proteínas que interajam com essas ubiquitina ligases podem ser importantes no tratamento do câncer. O BTCL, por apresentar similaridade estrutural com a ubiquitina, em sua região de reconhecimento, pode estar envolvido nessas vias de ubiquitinação, interagindo com proteínas E3 ligases e, conseqüentemente, atuando diretamente nos efeitos anticarcinogênicos, como demonstrados anteriormente (Joanitti *et al.*, 2010). Supondo que o BTCL compete com a ubiquitina pelo seu reconhecimento pela E3 ligase, ele pode diminuir os efeitos de proteínas E3 superexpressadas, como a Mdm2 (superexpressada em células MCF-7) e Skp2, e assim, estabilizar proteínas

regulatórias do ciclo celular, induzindo efeitos citotóxicos e citostáticos desse inibidor, como foi observado em células de câncer de mama MCF-7 (Joanitti *et al.*, 2010). Embora os dados obtidos nessa dissertação e aqueles publicados recentemente (Joanitti *et al.*, 2010) apontam para um possível efeito do BTCI na via de ubiquitinação, ensaios complementares precisam ser realizados visando a compreensão do papel desse inibidor diretamente com membros da família E3 ligases.

O BTCI vem sendo estudado como potencial molécula anticarcinogênica, entretanto, o mecanismo molecular envolvido nesse efeito, ainda não foi elucidado. Estudos morfológicos e de viabilidade celular já foram relatados, indicando que o BTCI reduz significativamente a viabilidade de células MCF-7 de maneira dose-dependente. O BTCI também induz efeitos citostáticos (Joanitti *et al.*, 2010), o que pode estar relacionado com modificações na expressão/produção de proteínas regulatórias do ciclo celular. A via-ubiquitina proteassoma é a principal via responsável pela regulação de proteínas regulatórias do ciclo celular, como as ciclinas e os inibidores de CDK (Sherr e Roberts, 1999).

Diversas análises morfológicas em células de câncer de mama, como a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, modificações na integridade da membrana e exposição de fosfatidilserina (fosfolípido) na membrana plasmática caracterizaram a via de morte celular do BTCI com a apoptose. Análises estruturais de células MCF-7 tratadas com BTCI também indicaram fragmentação da membrana plasmática, desorganização do citoplasma, presença de vesículas com membrana dupla, aumento do tamanho lisossomal, baixa acidificação do lisossoma e aumento da acidificação do citoplasma. Essas características indicam que o BTCI induz morte celular por permeabilização da membrana lisossomal (LMP) (Joanitti *et al.*, 2010). O LMP é caracterizado por uma perturbação da função da membrana do lisossomo levando à translocação de hidrolases lisossomais do lúmen do lisossoma para o restante da célula (Kirkegaard e Jäättelä, 2009). Frequentemente, essas hidrolases levam à apoptose por indução de permeabilização da membrana mitocondrial e ativação de caspase (Groth-Pedersen *et al.*, 2007; Kirkegaard e Jäättelä, 2009).

Todos esses dados indicaram que o BTCl apresentou efeitos citostáticos e citotóxicos em células de câncer de mama associado com processos de apoptose e de permeabilização da membrana lisossomal (Joanitti *et al.*, 2010). Similarmente, Berndtsson e colaboradores (2009) mostraram que inibidores de proteassoma podem induzir a apoptose via permeabilização da membrana lisossomal em células de câncer de mama, o que corrobora com os resultados mostrados nesse trabalho. O BTCl, ao inibir a via ubiquitina-proteassoma pode induzir efeitos de morte celular, sendo esse o primeiro passo na elucidação das vias moleculares nas quais esse inibidor está envolvido.

Inibidores de proteassoma relacionados com a via de permeabilização da membrana lisossomal (LPM) induziram estresse no retículo endoplasmático e acúmulo de proteínas ubiquitinadas de alta massa molecular sem, no entanto, inibir diretamente a atividade catalítica do proteassoma 20S (Berndtsson *et al.*, 2009). O inibidor de proteassoma Bortezomibe apresentou indução de estresse pro-apoptótico no retículo endoplasmático, mas com inibição direta das atividades quimotripsina-*like* e caspase-*like* do proteassoma 20S (Fribley e Wang, 2006). Esses dados mostram que inibidores de proteassoma podem estar envolvidos em diversas vias moleculares que levam à apoptose. Como o BTCl não induziu acúmulo de proteínas ubiquitinadas em células de câncer mama (figura 29), mas apresentou forte inibição das três atividades catalíticas do proteassoma 20S (figura 13), é provável que esse inibidor esteja associado com a via de apoptose por permeabilização da membrana lisossomal de forma mais complexa.

O envolvimento de inibidores Bowman-Birk na via ubiquitina-proteassoma em células de câncer de mama foi relatado por Chen e colaboradores 2005, para o inibidor Bowman-Birk extraído de sementes de soja (BBI). O BBI inibe a atividade quimotripsina-*like* do proteassoma 26S em células MCF-7 e está associado com o acúmulo de proteínas ubiquitinadas e de substratos do proteassoma como a p21 e a p27. O inibidor também induziu o aumento de ciclinas D e E, e contribuiu para a interrupção do ciclo celular na fase G1/S. Além disso, o BBI causou a diminuição de proteínas ERK ½ fosforiladas (quinase relacionada com sinais extracelulares), por meio do acúmulo da fosfatase de MAP quinase 1 (MKP - 1). A MKP-1 é degradada pela via ubiquitina-proteassoma e retira fosfatos da ERK ½, um de seus substratos,

inativando-a (Chen *et al.*, 2005). Em células de osteosarcoma (U2OS), a inibição do proteassoma pelo BBI também induziu a ativação da conexina-43, um gene supressor de tumor (Saito *et al.*, 2007).

O BTCI apresenta estrutura tridimensional e atividade inibitória contra a quimotripsina e a tripsina semelhantes às do inibidor de protease BBI, entretanto apresentou diferenças nos efeitos anticarcinogênicos quando comparado com o BBI. O BBI causa apenas efeitos citostáticos em células cancerosas (Chen *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2007), enquanto o BTCI causa efeitos citostáticos e citotóxicos. Além disso, o BBI promove a parada do ciclo celular na fase G1/S, inibe apenas a atividade quimotripsina-*like* do proteassoma e induz o acúmulo de proteínas ubiquitinadas (Chen *et al.*, 2005). O BTCI induz a parada do ciclo celular na fase G2/M (Joanitti *et al.*, 2010), inibe as três atividades proteolíticas do proteassoma (figura 13), além de não apresentar acúmulo de proteínas ubiquitinadas em células de câncer de mama (figura 29).

O BBI e o BTCI têm sido descritos como importantes agentes na supressão da carcinogênese (Joanitti *et al.*, 2010; Kennedy, 1998). Entretanto, essas moléculas parecem não estar envolvidas nas mesmas vias moleculares relacionadas ao câncer de mama, como apresentado acima. Os resultados desse trabalho indicam que o BTCI não só está envolvido com a inibição do proteassoma, mas também com outras vias moleculares, como as de ubiquitina E3 ligases.

O trabalho aqui apresentado é o primeiro estudo realizado analisando vias moleculares e interações com proteínas envolvidas no efeito anticarcinogênico do BTCI em células de câncer de mama. Esse trabalho indica que o BTCI interfere na via ubiquitina-proteassoma de forma complexa, associando-se tanto ao proteassoma como às proteínas de ligação à ubiquitina (E1, E2 e/ou E3 ligases), o que leva à desregulação no ciclo celular e posterior parada no crescimento celular e morte. Entretanto, diversos outros estudos ainda precisam ser realizados para elucidar o mecanismo de ação do BTCI na terapia contra o câncer.

Vários trabalhos mostram que a interação com o proteassoma e as ubiquitinas E3 ligases está envolvida em efeitos anticarcinogênicos (Revisado por Voorhees *et al.*, 2003 e por Sun, 2003). Portanto, o BTCI, por estar

relacionado com a via ubiquitina-proteassoma, torna-se um agente anticarcinogênico ainda mais promissor com vistas ao tratamento e prevenção de câncer de mama.

## **9. CONCLUSÕES**

- 1) O BTCl inibe as três atividades proteolíticas do proteassoma 20S: quimotripsina, tripsina e caspase-*like*. O inibidor apresenta maior afinidade pelo sítio da tripsina e menor, pelo sítio da caspase.
- 2) O peptídeo derivado do BTCl, Pep1, inibe as três atividades do proteassoma 20S com afinidades diferentes, sendo as atividades quimotripsina-*like* e caspase-*like* a mais inibida e a menos inibida, respectivamente.
- 3) O peptídeo derivado do BTCl, Pep2, inibe a atividade tripsina-*like* do proteassoma 20S. Ele ativa a atividade de quimotripsina em baixas concentrações, mas em concentrações mais altas, inibe essa atividade em aproximadamente 50%.
- 4) O BTCl e o proteassoma 20S formam complexos estáveis em temperaturas até 55°C e em pHs neutros e básicos.
- 5) NaCl promove a dissociação do complexo BTCl-Proteassoma 20S.
- 6) O proteassoma 20S é estável em pHs neutros e básicos, até 55°C. A partir dessa temperatura ocorre provavelmente dissociação das subunidades desse complexo proteolítico.
- 7) Em pHs ácidos, o proteassoma 20S apresenta alta estabilidade até 95°C, o que pode ser explicado pela sua tendência de agregação.

- 8) O BTCl atravessa a membrana das células de câncer de mama MCF-7 e é citolocalizado com o proteassoma no núcleo e no citoplasma.
- 9) O BTCl, assim como o Pep1, causam ligeira diminuição da ubiquitinação de proteínas em células MCF-7. O Pep2 causa diminuição de ubiquitinação com 2 horas de incubação, efeito não mais evidenciado com 4 horas.
- 10) O BTCl apresenta similaridade estrutural de 39% com a ubiquitina, principalmente na região C-terminal de ambas as moléculas. A região C-terminal do BTCl (Pep1) inibe a atividade quimotripsina-*like*.
- 11) Os resultados acima indicam que o BTCl inibe as atividades do proteassoma 20S e provavelmente também está envolvido na inibição de enzimas (E3 ligase, por exemplo) relacionadas com a ubiquitinação de proteínas celulares.
- 12) Os dados deste trabalho indicam, portanto, que a via ubiquitina-proteassoma está relacionada aos efeitos anticarcinogênicos do inibidor BTCl em células de câncer de mama, MCF-7.



## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 349 – 360, 2004.
- ADAMS, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, p. 2 - 9, 2003.
- ADAMS, J.; PALOMBELLA, V. J.; SAUSVILLE, E. A.; JOHNSON, J.; DESTREE, A.; LAZARUS, D. D.; MAAS, J.; PIEN, C. S.; PRAKASH, S.; ELLIOTT, P. J. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. **Cancer Res.**, v. 59, p. 2615 – 2622, 1999.
- ADJEI, A. A. Novel combinations based on epidermal growth factor receptor inhibition. **Clin Cancer Res**, v. 12, p. 4446 – 4450, 2006.
- AGYIN, J. K.; SANTHAMMA, B.; NAIR, H. B.; ROY, S. S.; TEKMAL, R. R. BU-32: a novel proteasome inhibitor for breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 11, p 1 – 13, 2009.
- AN, B.; GOLDFARB, R. H.; SIMAN, R.; DOU, Q. P. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. **Cell Death Differ**, v. 5, p. 1062 – 1075, 1998.
- ANDERSON, W. F.; JATOI, I.; DEVESA, S. S. Distinct breast cancer incidence and prognostic patterns in the NCI's SEER program: suggesting a possible link between etiology and outcome. **Breast Cancer Res Treat**, v. 90, p. 127 – 37, 2005.
- ARDELT, W.; LASKOWSKI, M. Turkey ovomucoid third domain inhibits eight different serine proteinases of varied specificity on the same ...Leu18-Glu19 ... reactive site. **Biochemistry**, v. 24, p. 5313- 5320, 1985.
- ARDELT, W.; LASKOWSKI, M. Thermodynamics and kinetics of the hydrolysis and resynthesis of the reactive site peptide bond in turkey ovomucoid third domain by aspergillopeptidase B. **Actu Biochim. Pol.**, v. 30, p 115 – 126, 1983.
- ARMSTRONG, W. B.; KENNEDY, A. R.; WAN, X. S.; TAYLOR, T. H.; NGUYEN, Q. A.; JENSEN, J.; THOMPSON, W.; LAGERBERG, W.; MEYSKENS JR, F. L. Clinical modulation of oral Leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. **Clin Cancer Res**, v. 6, p. 4684 – 4691, 2000.
- ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; BOLOGNESI, M.; SPALLAROSSA, A.; COLETTA, M.; DE CRISTOFARO, R.; MENEGATTI, E. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. **Curr Protein & Peptide Sci**, v. 4, p. 231 – 251, 2003.
- BALDWIN, E. T.; CRUMLEY, K. V.; CARTER, C. W. Practical, Rapid Screening of Protein Crystallization Conditions by Dynamic Light Scattering. **Biophys J.**, v. 49 (1), p. 47 – 48, 1986.
- BARBOSA, J. A. R. G.; SILVA, L. P.; TELES, R. C. L.; ESTEVES, G. F.; AZEVEDO, R. B.; VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M. Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with b-Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 1638 – 1650, 2007.
- BARBOSA, J. A.; TELES, R. C.; FORRER, V. P.; GUIMARÃES, B. G.; MEDRANO, F. J.; VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M. Crystallization, data collection and phasing of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor in complex with bovine beta-trypsin. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.**, v. 59, p. 1828 - 1830, 2003.

- BAUMEISTER, W.; WALZ, J.; ZUHL, F.; SEEMULLER, E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. **Cell**, v. 92, p. 367 – 380, 1998.
- BENSON, J. R.; JATOI, I.; KEISCH, M.; ESTEVA, F. J.; MAKRIS, A.; JORDAN, V. C. Early breast cancer. **Lancet**, v. 373, p. 1463 – 79, 2009.
- BERAL, V.; HERMON, C.; REEVES, G.; PETO, R.; Sudden fall in breast cancer death rates in England and Wales. **Lancet**, v. 345, p. 1642 – 1643, 1995.
- BERNDTSSON, M.; RICKARDSON, L.; HAVELKA, A. M.; LARSSON, R.; WESTMAN, J.; LIAUDET-COOPMAN, E.; LINDER, S. Induction of the lysosomal apoptosis by inhibitors of the ubiquitin-proteasome system. **Int. J. Cancer**, v. 124, p. 1463 – 1469, 2009.
- BERRY, D. A.; CRONIN, K. A.; PLEVITIS, S. K.; FRYBACK, D. G.; CLARKE, L.; ZELEN, M.; MANDELBLATT, J. S.; YAKOVLEV, A. Y.; HABBEMA, J. D.; FEUER, E. J. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. **N Engl J Med**, v. 353, p. 1784 – 92, 2005.
- BILLINGS, P. C.; CAREW, J. A.; KELLER-MCGANDY, C. E.; GOLDBERG, A.; KENNEDY, A. R. A serine protease activity in C3H/10T1/2 cells that is inhibited by anticarcinogenic protease inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 84, p. 4801 – 4805, 1987.
- BIRK, Y. The Bowman-Birk protease inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitors from soybeans. **Int J Peptide Protein Res**, v. 25, p. 113 - 131, 1985.
- BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 7, p. 241 – 252, 2000.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **Eur. J. Biochem**, v. 204, p. 433 – 451, 1992.
- BOULTON, S. J.; MARTIN, J. S.; POLANOWSKA, J.; HILL, D. E.; GARTNER, A.; VIDAL, M. BRCA1/BARD1 orthologs required for DNA repair in *Caenorhabditis elegans*. **Curr. Biol**, v. 14, p. 33 – 39, 2004.
- BRAUER, A. B. E.; KELLY, G.; MCBRIDE, J. D.; COOKE, R. M.; MATTHEWS, S. J.; LEATHERBARROW, R. J. The Bowman-Birk inhibitor reactive site loop sequence represents an independent structural beta-hairpin motif. **J Mol Biol**, v. 306, p. 799 – 807, 2001.
- BROXTERMAN, H. J.; GEORGOPAPADAKOU, N. Anticancer therapeutics: addictive targets, multi-targeted drugs, new drug combinations. **Drug Resist Updates**, v. 8, p. 183 – 197, 2005.
- CARDOSO, F.; ROSS, J. S.; PICART, M. J.; SOTIRIOU, C.; DURBECQ, V. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer. **Clin Breast Cancer**, v. 5, p. 148 – 157, 2004.
- CARIOU, S.; DONOVAN, J. C.; FLANAGAN, W. M.; MILIC, A.; BHATTACHARYA, N.; SLINGERLAND, J. M. Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 97, p. 9042 – 9046, 2000.
- CARRANO, A. C.; EYTAN, E.; HERSHKO, A.; PAGANO, M. Skp2 is required for the ubiquitin-mediated degradation of the Cdk-inhibitor p27. **Nature Cell Biol**, v. 1, p. 193-199, 1999.
- CARVALHO, A. F.; SANTOS-NETO, M. S.; MONTEIRO, H. S. A.; FREITAS, S. M.; MORHY, L.; NASCIMENTO, N. R. F.; FONTELES, M. C. BTCl enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. **Braz J Biol**, v. 68 (1), p. 149 - 154, 2008.
- CATALANO, M.; RAGONA, L.; MOLINARI, H.; TAVA, A.; ZETTA, L. Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): solution structure and analysis of self-association behavior. **Biochemistry**, v. 42, p. 2836 – 2846, 2003.

- CATZAVELOS, C.; BHATTACHARYA, N.; UNG, Y. C.; WILSON, J. A.; RONCARI, L.; SANDHU, C.; SHAW, P.; YEGER, H.; MORAVA-PROTZNER, I.; KAPUSTA, L.; FRANSSSEN, E.; PRITCHARD, K. I.; SLINGERLAND, J. M. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. **Nat Med.**, v. 3, p. 227 – 230, 1997.
- CHEN, A.; KLEIMAN, F. E.; MANLEY, J. L.; OUCHI, T.; PAN, Z. Q. Auto-ubiquitination of the BRCA1/BARD1 RING ubiquitin ligase. **J. Biological Chemistry**, v. 277, p. 22085-22092, 2002.
- CHEN, J.; NIKOLOVSKA-COLESKA, Z.; WANG, G.; QIU, S.; WANG, S. Design, synthesis, and characterization of new embelin derivatives as potent inhibitors of X-linked inhibitor of apoptosis protein. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16, p. 5805 – 5808, 2006.
- CHEN, L.; TIANQING, L. Interaction behaviors between chitosan and hemoglobin. **Int J Biol Macromol.**, v. 42 (5), p. 441 – 446, 2008.
- CHEN, Y. W.; HUANG, S.; LIN-SHIAU, S.; LIN, J. 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 (7), p. 1296 - 1306, 2005.
- CIECHANOVER, A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitinproteasome system and onto human diseases and drug targeting. **Cell Death Differ**, v. 12, p. 1178 - 1190, 2005.
- CIECHANOVER, A.; BEN-SAADON, R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. **Trends Cell Biol**, v. 14, p. 103 – 106, 2004.
- CIECHANOVER, A.; Iwai, K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. **IUBMB Life**, v. 56, p. 193 – 201, 2004.
- CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome pathway: On protein death and cell life. **EMBO J**, v. 17, p. 7151 - 7160, 1998.
- CLEMENTE, A.; DOMONEY, C. Biological Significance of Polymorphism in Legume Protease Inhibitors from the Bowman-Birk Family. **Current Protein and Peptide Science**, v. 7, p. 201 - 216, 2006.
- CLEMMESSEN, J. Carcinoma of the breast; results from statistical research. **Br J Rad**, v. 21, p. 583 – 590, 1948.
- COLEMAN, M. L.; MARSHALL, C. J.; OLSON, M. F. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 355 - 366, 2004.
- COURJAL, F.; CUNY, M.; RODRIGUEZ, C.; LOUASON, G.; SPEISER, P.; KATSAROS, D.; TANNER, M. M.; ZEILLINGER, R.; THEILLET, C. DNA amplifications at 20q13 and MDM2 define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours. **Br. J. Cancer**, v. 74, p. 1984 – 1989, 1996.
- COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 801 - 847, 1996.
- CRAWFORD, L. J.; WALKER, B.; OVAA, H.; CHAUHAN, D.; ANDERSON, K. C.; MORRIS, T. C.; IRVINE, A. E. Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLCOCOCHO, PS-341, and MG-132. **Cancer Res.**, v. 66, p. 6379 - 6386, 2006.
- CUNY, M.; KRAMAR, A.; COURJAL, F.; JOHANNSDOTTIR, V.; IACOPETTA, B.; FONTAINE, H.; GRENIER, J.; CULINE, S.; THEILLET, C. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. **Cancer Res.**, v. 60, p. 1077 – 1083, 2000.

D'AVANZO, B.; LA VECCHIA, C. Risk factors for male breast cancer. **Br J Cancer**, v. 71, p. 1359 - 62, 1995.

DAHLMANN, B.; KOPP, F.; KUEHN, L.; NIEDEL, B.; PFEIFER, G.; HEGERL, R.; BAUMEISTER, W. The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archeobacteria. **FEBS Lett**, v. 251 (1-2), p. 125 - 131, 1989.

DARMOUL, D.; GRATIO, V.; DEVAUD, H.; LEHY, T.; LABURTHE, M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. **Am J Pathol**, v. 162, p. 1503 – 1513, 2003.

DE LEO, F.; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L. R. PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. **Nucl Acids Res**, v. 30, p. 347 – 348, 2002.

DELIC, J.; MASDEHORS, P.; OMURA, S.; COSSET, J. M.; DUMONT, J.; BINET, J. L.; MAGDELENAT, H. The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF- $\alpha$ -initiated apoptosis. **Br J Cancer**, v. 77, p. 1103 – 1107, 1998.

DEMARCHI, F.; BRANCOLINI, C. Altering protein turnover in tumor cells: new opportunities for anti-cancer therapies. **Drug Resist Updates**, v. 8, p. 359 –368, 2005.

DEMARTINO, G. N.; GILLETE, T. G. Proteasomes: machines for all reasons. **Cell**, v. 129, p. 659 - 662, 2007.

DEMASI, M.; SILVA, G. M.; NETTO, L. E. 20S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* is responsive to redox modifications and is S-glutathionylated. **J Biol Chem**, v. 278, p. 679 – 685, 2003.

DITTMANN, K.; TOULANY, M.; CLASSEN, J.; HEINRICH, V.; MILAS, L.; RODEMANN, H. P. Selective Radioprotection of Normal Tissues by Bowman-Birk Proteinase Inhibitor (BBI) in Mice. **Strahlenther Onkol**, v. 181, p. 191 – 196, 2005.

DITTMANN, K.; GUEVEN, N.; MAYER, C.; RODEMANN, H. P. The radioprotective effect of BBI is associated with the activation of DNA repair-relevant genes. **Int J Radiat Biol**, v. 74, p. 225 – 230, 1998.

DITTMANN, K.; LOFFLER, H.; BAMBERG, M.; RODEMANN, H. P. Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. **Radiother. Oncol.**, v. 34, p. 137 – 143, 1995.

DOMINGO, G. J.; LEATHERBARROW, R. J.; FREEMAN, N.; PATEL, S.; WEIR, M. Synthesis of a mixture of cyclic peptides based on the Bowman-Birk reactive site loop to screen for serine protease inhibitors. **Int J Pept Protein Res**, v. 46, p. 79 – 87, 1995.

DONEHOWER, L. A.; BRADLEY, A. The tumor suppressor p53. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1155, p. 181 – 205, 1993.

DOU, Q. P.; GOLDFARB, R. H. Bortezomib (millennium pharmaceuticals). **IDrugs**, v. 5 (8), p. 828 – 834, 2002.

ELLIS, R. E.; YUAN, J.; HORWITZ, H. R. Mechanisms and functions of cell death. **Annu Rev Cell Biol**, v. 7, p. 663 - 698, 1991.

ESTEVES, G. F. *Resolução da estrutura tridimensional do inibidor trípico e quimotríptico de Vigna unguiculata em complexos binário e ternário.* 2010. 161f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

ESTEVEES, G. F.; TELES, R. C.; CAVALCANTE, N. S.; NEVES, D.; VENTURA, M. M.; BARBOSA, J. A.; DE FREITAS, S. M. Crystallization, data collection and processing of the chymotrypsin-BTCI-trypsin ternary complex. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.**, v. 63, p. 1087 - 1090, 2007.

FACHETTI, H. C. S.; MIZUTA, K.; VENTURA, M. M. Thermodynamics of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. **An Acad Bras Cienc**, v. 56, p. 311 – 317, 1984.

FARADY, C. J.; SUN, J.; DARRAGH, M. R.; MILLER, S. M.; CRAIK, C. S. The Mechanism of Inhibition of Antibody-based Inhibitors of Membrane-type Serine Protease 1 (MT-SP1). **J Mol Biol**, v. 369 (4), p. 1041 - 1051, 2007.

FELDMAN, R. M.; CORRELL, C. C.; KAPLAN, K. B.; DESHAIES, R. J. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. **Cell**, v. 91, p. 221-230, 1997.

FENTEANY, G.; STANDAERT, R.; REICHARD, G. A.; COREY, E. J.; SCHREIBER, S. L. A  $\beta$ -lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. **PNAS USA**, v. 91, p. 3358 - 3362, 1994.

FONTANA, X.; FERRARI, P.; ABBES, M.; MONTICELLI, J.; NAMER, M.; BUSSIERE, F. Study of *mdm2* gene amplification in primary breast tumors. **Bull. Cancer (Paris)**, v. 81, p. 587 – 592, 1994.

FONTHAM, E.; CORREA, P. The epidemiologic approach to the study of protease inhibitors. In: W. Troll and A. R. Kennedy (eds.), *Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*. **New York: Plenum Publishing Corp**, p. 1 –8, 1993.

FORD, D.; EASTON, D. F. The genetics of breast and ovarian cancer. **Br J Cancer**, v. 72, p. 805 – 812, 1995.

FOSTER, J. S.; FERNANDO, R. I.; ISHIDA, N.; NAKAYAMA, K. I.; WIMALASENA, J. Estrogens down-regulate p27Kip1 in breast cancer cells through Skp2 and through nuclear export mediated by the ERK pathway. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 41355 – 41366, 2003.

FRANCO, O. L.; SANTOS, R. C.; BATISTA, J. A. N.; MENDES, A. C. M.; ARAÚJO, A.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FREITAS, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v. 63, 343 – 349, 2003.

FREITAS, S. M.; IKEMOTO, H.; VENTURA, M. M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI). **J Protein Chem**, v. 18, p. 307 – 313, 1999.

FREITAS, S. M.; DE MELLO, L. V.; DA SILVA, M. C.; VRIEND, G.; NESHICH, G.; VENTURA, M. M. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-a-chymotrypsin complex. **FEBS Lett.**, v. 409, p. 121 – 127, 1997.

FRIBLEY, A.; WANG, C. Proteasome Inhibitor Induces Apoptosis through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, p. 745 - 748, 2006.

GACZYNSKA, M.; OSMULSKI, P.A.; GAO, Y.; POST, M. J.; SIMONS, M. Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity. **Biochemistry**, v. 42, p. 8663 - 8670, 2003.

GALLO, R. L.; ONO, M.; POVSIC, T.; PAGE, C.; ERIKSSON, E.; KLAGSBRUN, M.; BERNFIELD, M. Syndecans, cell surface heparin sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. **PNAS USA**, v. 91, p. 11029 - 11035, 1994.

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

GARIANI, T.; LEATHERBARROW, R. J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. **J Pept Res**, v. 49, p. 467 – 475, 1997.

GHISLAIN, M.; UDVARDY, A.; MANN, C. S. *Cerevisiae* 26S proteasome mutants arrest cell division in G2/metaphase. **Nature**, v. 366, p. 358 - 361, 1993.

GLICKMAN, M. H.; RUBIN, D. M.; FRIED, V. A.; FINLEY, D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. **Mol Cell Biol**, v. 18, p. 3149 – 3162, 1998.

GOY, A.; YOUNES, A.; MCLAUGHLIN, P.; PRO, B.; ROMAGUERA, J. E.; HAGEMEISTER, F.; FAYAD, L.; DANG, N. H.; SAMANIEGO, F.; WANG, M.; BROGLIO, K.; SAMUELS, B.; GILLES, F.; SARRIS, A. H.; HART, S.; TREHU, E.; SCHENKEIN, D.; CABANILLAS, F.; RODRIGUEZ, A. M. Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 667 - 675, 2005.

GRIFFIN, T. A.; NANDI, D.; CRUZ, M.; FEHLING, H. J.; KAER, L. V.; MONACO, J. J.; COLBERT, R. A. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. **J Exp Med**, v. 187, p. 97 – 104, 1998.

GROLL, M.; BERKERS, C. R.; PLOEGH, H. L.; OVAA, H. Crystal Structure of the Boronic Acid-Based Proteasome Inhibitor Bortezomib in Complex with the Yeast 20S Proteasome Structure. **Structure**, v. 14, p. 451–456, 2006.

GROLL, M.; HUBER, R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. **Internat J Biochem**, v. 35, p. 606 - 616, 2003.

GROLL, M.; KIM, K. B.; KAIRIES, N.; HUBER, R.; CREWS, C. M. Crystal structure of epoxomicin: 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of alpha 'beta' – epoxyketone proteasome inhibitors. **J Am Chem Soc**, v. 122, p. 1237 – 1238, 2000.

GROLL, M.; HEINEMEYER, W.; JÄGER, S.; ULLRICH, T.; BOCHTLER, M.; WOLF, D. H.; HUBER, R. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: A mutational and crystallographic study, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 10976-10983, 1999.

GROTH-PEDERSEN, L.; OSTENFELD, M. S.; HØYER-HANSEN, M.; NYLANDSTED, J.; JÄÄTTELÄ, M. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. **Cancer Res.**, v. 67, p. 2217 – 2225, 2007.

GSTAIGER, M.; JORDAN, R.; LIM, M.; CATZAVELOS, C.; MESTAN, J.; SLINGERLAND, J.; KREK, W. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 5043-5048, 2001.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864 – 3874, 1991.

HAN, J.; MA, I.; HENDZEL, M. J.; ALLALUNIS-TURNER, J. The cytotoxicity of  $\gamma$ -secretase inhibitor I to breast cancer cells is mediated by proteasome inhibition, not by  $\gamma$ -secretase inhibition. **Breast Cancer Research**, v. 11, p. 1 – 12, 2009.

HANKINSON, S. E.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. **Breast Cancer Res Treat**, v. 6, p. 213 – 218, 2004.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: Natural and engineered phytoprotection. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 431, p. 145 - 159, 2004.

HARRIS, J. L.; ALPER, P. B.; LI, J.; RECHSTEINER, M.; BACKES, B. J. Substrate specificity of the human proteasome. **Chem Biol**, v. 8, p. 1131 –1141, 2001.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, p. 1821 – 1828, 1994.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629 – 634, 1989.

HAUPT, Y.; MAYA, R.; KAZAZ, A.; OREN, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature**, v. 387, p. 296 – 299, 1997.

HEINEMEYER, W.; FISCHER, M.; KRIMMER, T.; STACHON, U; WOLF, D. H. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. **J Biol Chem**, v. 272, p. 25200–25209, 1997.

HEINEMEYER, W.; GRUHLER, A.; MÖHRLE, V.; MAHÉ, Y.; WOLF, D. H. PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. **J Biol Chem**, v. 268, p. 5115–5120, 1993.

HEINEMEYER, W.; KLEINSCHMIDT, J. A.; SAIDOWSKY, J.; ESCHER, C.; WOLF, D. H. Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. **Embo J**, v. 10, p. 555-562, 1991.

HENDIL, K. B.; KHAN, S.; TANAKA, K. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes. **Biochem J**, v. 332, p. 749 – 754, 1998.

HICKE, L. Protein regulation by monoubiquitin. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, p. 195 – 201, 2001.

HILDER, V. A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance: a critical review. **Crop Prot**, v. 18, p. 177 – 191, 1999.

HORTOBAGYI, G. N.; DE LA GARZA SALAZAR, J.; PRITCHARD, K.; AMADORI D. ; HAIDINGER R.; HUDIS, C. A.; KHALED, H.; LIU, M. C.; MARTIN, M.; NAMER, M.; O'SHAUGHNESSY, J. A.; SHEN, Z. Z.; ALBAIN, K. S. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. **Clin Breast Cancer**, v. 6, p. 391 – 401, 2005.

HORTON, T. M.; GANNAVAPU, A. S.; BLANEY, M.; D'ARGENIO, D. Z.; PLON, S. E.; BERG, S. L. Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia in vitro. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 58, p. 13 – 23, 2006.

HUBER, R.; KUKLA, D.; BODE, W.; SCHWAGER, P.; BARTELS, K.; DEISENHOFER, J.; STEIGEMANN, W. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 89, p. 73 – 101, 1974.

INCA, 2010. Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama - Viva Mulher. Disponível em <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>

IKENAKA ,T.; NORIOKA, S. Bowman-Birk family serine proteinase inhibitors. In: Barrett A. J.; Salvesen, G. (eds). Proteinase Inhibitors, **Wagenigen, Elsevier Science**, cap. 9, p. 361 – 371, 1986.

JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Letters**, no prelo, 2010.

JOANITTI, G. A. *Efeitos citostáticos e citotóxicos do inibidor de proteases – BTC1 – e peptídeos derivados em células de câncer de mama (MCF-7)*. 2008. 125f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

JOSHI, B.; SAINANI, M.; BASTAWADE, K.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Cyteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 246, p. 382 – 387, 1998.

KATO, G. J. Human genetic diseases of proteolysis. **Hum Mutat**, v. 13, p. 87 – 98, 1999.

KENNEDY, A. R. The Bowman-Birk inhibitor from soybean as an anticarcinogenic agent. **Am J Clin Nutr**, v. 68, p. 1406 – 1412, 1998.

KENNEDY, A. R. Prevention of Carcinogenesis by Protease Inhibitors. **Cancer Research (Suppl.)**, v. 54, p. 1999 – 2005, 1995.

KENNEDY, A. R. In vitro studies of anticarcinogenic protease inhibitors. In: Troll, W. e Kennedy, A. R. (eds.). *Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*, **New York: Plenum Publishing Corp**, p. 65 – 91, 1993a.

KENNEDY, A. R. Overview: anticarcinogenic activity of protease inhibitors. In: Troll W.; Kennedy, A. R.. (eds). *Protease inhibitors as Cancer Chemopreventive agents*. **New York: Plenum Press**, p. 9 – 64, 1993b.

KENNEDY, A. R.; SZUHAJ, B. F.; NEWBERNE, P. M.; BILLINGS, P. C. Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate. **Nutr. Cancer**, v. 19, p. 281- 302, 1993c.

KIM, J. H.; PARK, K. C.; JUNG, S. S.; BANG, O.; CHUNG, C. H. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. **J Biochem**, v. 134, p. 9 – 18, 2003.

KING, M. C.; MARKS, J. H.; MANDELL, J. B. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. **Science**, v. 302, p. 643 – 646, 2003.

KING, R. W. How proteolysis drives the cell cycle. **Science**, v. 274, p. 1652 -1659, 1996.

KIRKEGAARD, T.; JÄÄTTELÄ, M. Lysosomal involvement in cell death and cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1793, p. 746 – 754, 2009.

KISSELEV, A. F.; KAGANOVICH, D.; GOLDBERG, A. L. Binding of Hydrophobic Peptides to Several Non-catalytic Sites Promotes Peptide Hydrolysis by All Active Sites of 20S Proteasomes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 22260–22270, 2002.

KLOETZEL, P-M. Antigen processing by the proteasome. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 2, p. 179 - 187, 2001.

KOEPKE, J.; ERMILER, U.; WARKENTIN, E.; WENZL, G.; FLECKER, P. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. **J. Mol. Biol.**, v. 298, p. 477 – 491, 2000.

KOEPP, D. M.; HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. How the Cyclin Became a Cyclin: Regulated Proteolysis in the Cell Cycle. **Cell**, v. 97, p. 431–434, 1999.



- KOPP, F.; HENDIL, K. B.; DAHLMANN, B.; KRISTENSEN, P.; SOBEK, A.; UERKVITZ, W. Subunit arrangement in the human 20S proteasome. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 2939-2944, 1997.
- KOPP, F.; STEINER, R.; DAHLMANN, B.; KUEHN, L.; REINAUER, H. Size and shape of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta**, v. 872 (3), p. 253 – 260, 1986.
- KUBBUTAT, M. H.; JONES, S. N.; VOUSDEN, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. **Nature**, v. 387, p. 299 – 303, 1997.
- LACERDA, S. H.; PARK, J. J.; MEUSE, C.; PRISTINSKI, D.; BECKER, M. L.; KARIM, A.; DOUGLAS, J. F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. **ACS Nano**, v. 4 (1), p. 365 - 379, 2010.
- LASKOWSKI, M.; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochem Biophys Acta**, v. 1477, p. 324 – 337, 2000.
- LASKOWSKI, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu Rev Biochem**, v. 49, p. 593 – 626, 1980.
- LATHAM, P. W. Therapeutic peptides revisited. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 755 - 757, 1999.
- LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 397 - 403, 1998.
- LEE, S. L.; DICKSON, R. B.; LIN, C. Y. Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. **J Biol Chem**, v. 275, p. 36720 – 36725, 2000.
- LI, Y. L.; HUANG, Q. C.; ZHANG, S. W.; LIU, S. P.; CHI, C. W.; TANG, Y. Q. Studies on artificial trypsin inhibitor peptide derived from mung bean trypsin inhibitor: Chemical synthesis, refolding, and crystallographic analysis of its complex with trypsin. **J Biochem**, v. 116, p. 18–25, 1994.
- LIANG, L.; YAO, P.; GONG, J.; JIANG, M. Interaction of apo cytochrome c with sulfonated polystyrene nanoparticles. **Langmuir**, v. 20 (8), p. 3333 – 3338, 2004.
- LIBICH, D. S.; HILL, C. M.; BATES, I. R.; HALLETT, F. R.; ARMSTRONG, S.; SIEMIARCZUK, A.; HARAUZ, G. Interaction of the 18.5-kD isoform of myelin basic protein with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: effects of deimination assessed by intrinsic Trp fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, and circular dichroism. **Protein Sci.**, v. 12 (7), p. 1507 – 1521, 2003.
- LIVINGSTONE, L. R.; WHITE, A.; SPROUSE, J.; LIVANOS, E.; JACKS, T.; TLSTY, T. D. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. **Cell**, v. 70, p. 923 – 935, 1992.
- LONARD, D. M.; NAWAZ, Z.; SMITH, C. L.; O'MALLEY, B. W. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. **Mol. Cell**, v. 5, p. 939–948, 2000.
- LORICK, K. L.; JENSEN, J. P.; FANG, S.; ONG, A. M.; HATAKEYAMA, S.; WEISSMAN, A. M. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 11364 – 11369, 1999.
- LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 48 (1), p. 94 – 118, 2008.

LÖWE, J.; STOCK, D.; JAP, B.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W.; HUBER, R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* at 3.4 Å resolution. **Science**, v. 268, p. 533 - 539, 1995.

LUCKETT, S.; GARCIA, R. S.; BARKER, J. J.; KONAREV, A. V.; SHEWRY, P. R.; CLARKE, A. R.; BRADY, R. L. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. **J Mol Biol**, v. 290, p. 525 – 533, 1999.

LUNDGREN, K.; MONTES DE OCA LUNA, R.; MCNEILL, Y. B.; EMERICK, E. P.; SPENCER, B.; BARFIELD, C. R.; LOZANO, G.; ROSENBERG, M. P.; FINLAY, C. A. Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. **Genes Dev.**, v. 11, p. 714 – 725, 1997.

LUPAS, A.; KOSTER, A. J.; BAUMEISTER, W. Structural features of 26S e 20S proteasomes. **Enzyme Protein**, v. 47, p. 252 - 273, 1993.

MA, M. H.; YANG, H. H.; PARKER, K. M.; MANYAK, S.; FRIEDMAN, J. M., ALATAMIRANO, C. V.; WU, Z. Q.; BORAD, M. J.; FRANTZEN, M.; ROUSSOS, E.; NEESSER, J.; MIKAIL, A.; ADAMS, J.; SJAK-SHIE, N.; VESCOIO, R. A.; BERENSON, J. R. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. **Clin Cancer Res**, v. 9, p. 1136 – 1144, 2003.

MAKI, P. A.; KENNEDY, A. R. Humoral and cellular immune functions are not compromised by the anticarcinogenic Bowman-Birk inhibitor. **Nutr Cancer**, v. 18 (2), p. 165 – 173, 1992.

MALKOWICZ, S. B.; MCKENNA, W. G.; VAUGHN, D. J.; WAN, X. S.; PROPERT, K. J.; ROCKWELL, K.; MARKS, S. H. F.; WEIN, A. J.; KENNEDY, A. R. Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. **Prostate**, v. 48 (1), p. 16 – 28, 2001.

MALLERY, D. L.; VANDENBERG, C. J.; HIOM, K. Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. **EMBO J.**, v. 21, p. 6755–6762, 2002.

MANI, A.; GELMANN, E. P. The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Its Role in Cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 4776- 4789, 2005.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews: Cancer**, v. 2, p. 143-148, 2002.

MANZONE, H.; BILLINGS, P. C.; CUMMINGS, W. N.; FELDMAN, R.; CLARK, L. C.; ODELL, C. S.; HORAN, A.; ATIBA, J. O.; MEYSKENS, F. L.; KENNEDY, A. R. Levels of proteolytic activities as intermediate marker endpoints in oral carcinogenesis. **Cancer Epidemiol Biomark Prev**, v. 4, p. 521 – 527, 1995.

MARCHETTI, A.; BUTTITTA, F.; GIRLANDO, S.; DALLA PALMA, P.; PELLEGRINI, S.; FINA, P.; DOGLIONI, C.; BEVILACQUA, G.; BARBARESCHI, M. *Mdm2* gene alterations and mdm2 protein expression in breast carcinomas. **J. Pathol.**, v. 175, p. 31 – 38, 1995.

MARQUART, M.; WALTER, J.; DEISENHOFER, J.; BODE, W.; HUBER, R. The geometry of the reactive site and of the peptide groups in trypsin, trypsinogen and its complexes with inhibitors. **Acta Crystallogr.**, v. B39, p. 480 – 490, 1983.

MARTIN, C. O.; VENTURA, M. M. Trypsin and chymotrypsin inhibitor of *Vigna unguiculata* seeds: involvement of tyrosyls in its interaction with proteases. **An Acad Bras Cienc.**, v. 58, p. 297 - 302, 1986.

MASSON, P.; ANDERSSON, O.; PETERSEN, U. M.; YOUNG, P. Identification and characterization of a Drosophila nuclear proteasome regulator. A homolog of human 11 S REG\_ (PA28\_). **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 1383 – 1390, 2001.

- MCBRIDE, J. D.; WATSON, E. M.; BRAUER, A. B. E.; JAULENT, A. M.; LEATHERBARROW, R. J. Peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor reactive site loop. **Biopolymers**, v. 66, p. 79 – 92, 2002.
- MCBRIDE, J. D.; FREEMAN, H. N.; LEATHERBARROW, R. J. Selection of human elastase inhibitors from a conformationally constrained combinatorial peptide library. **Eur J Biochem**, v. 266, p. 403 – 412, 1999.
- MCBRIDE, J. D.; BRAUER, A. B. E.; NIEVO, M.; LEATHERBARROW, R. J. The role of threonine in the P-2 position of bowman-birk proteinase inhibitors: Studies on P-2 variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. **J Mol Biol**, v. 282, p. 447 – 457, 1998.
- MCCANN, A. H.; KIRLEY, A.; CARNEY, D. N.; CORBALLY, N.; MAGEE, H. M.; KEATING, G.; DERVAN, P. A. Amplification of the *MDM2* gene in human breast cancer and its association with MDM2 and p53 protein status. **Br. J. Cancer**, v. 71, p. 981 – 985, 1995.
- MCCUTCHEN-MALONEY, S. L.; MATSUDA, K.; SHIMBARA, N.; BINNS, D. D.; TANAKA, K.; SLAUGHTER, C. A.; DEMARTINO, G. N. cDNA cloning, expression and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275 (24), p. 18557 -18565, 2000.
- MCDONALD, E. R.; EL-DEIRY, W. S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. **Int J Oncol**, v. 16, p. 871 – 886, 2000.
- MCGRAIN, A. K.; CHEN, J. C.; WILSON, K. A.; TAN-WILSON, A. L. Degradation of trypsin inhibitors during soybean germination. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1013 - 1017, 1989.
- MCINTOSH, G. G.; ANDERSON, J. J.; MILTON, I.; STEWARD, M.; PARR, A. H.; THOMAS, M. D.; HENRY, J. A.; ANGUS, B.; LENNARD, T. W.; HORNE, C. H. Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. **Oncogene**, v. 11, p. 885–891, 1995.
- MEERAN, S. M.; KATIYAR, S. K. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. **Front Biosci**, v. 13, p. 2191 – 2202, 2008.
- MELLO, M. O.; TANAKA, A. S.; SILVA-FILHO, M. C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Mol Phylogenet Evol**, v. 27, p. 103 – 112, 2003.
- MENG, L.; MOHAN, R.; KWOK, B. H.; ELOFSSON, M.; SIN, N.; CREWS, C. M. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 10403 – 10408, 1999.
- MESSINA, M. J.; PERSKY, V.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. **Nutr Cancer**, v. 21, p. 113 – 131, 1994.
- MESSINA, M.; BARNES, S. The role of soy products in reducing risk of cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 83, p. 541 – 546, 1991.
- MEYSKENS, F. L. Development of Bowman-Birk inhibitor for chemoprevention of oral head and neck cancer. **Ann N Y Acad Sci**, v. 952, p.116 – 123, 2001.
- MICHALIDES, R. J. Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer. **J Clin Pathol**, v. 52, p. 555 –568, 1999.
- MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P. A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; COCHRAN, C.; BENNETT, L. M.; DING, W., *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, p. 66–71, 1994.

- MIZUTA, K.; IKEMOTO, H.; VENTURA, M. M. Hydrogen-deuterium exchange in the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor and its complex with beta-trypsin. **An Acad Bras Cienc.**, v. 52, p. 633 – 641, 1980.
- MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, v. 33, p. 261 - 274, 2000.
- MORABITO, A.; DE MAIO, E.; DI MAIO, M.; NORMANNO, N.; PERRONE, F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. **Oncologist**, v. 11, p. 753 –764, 2006.
- MORHY, L.; VENTURA, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) WalP seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. **An Acad Bras Cienc**, v. 59, p. 71 – 81, 1987.
- MORTENSON, M. M.; SCHLIEMAN, M. G.; VIRUDACHALAM, S.; BOLD, R. J. Effects of the proteasome inhibitor Bortezomib alone and in combination with chemotherapy in the A549 non-small-cell lung cancer cell line. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 54 (4), p. 343 – 353, 2004.
- MUSGROVE, E. A.; LEE, C. S.; BUCKLEY, M. F.; SUTHERLAND, R. L. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 8022–8026, 1994.
- NAKAYAMA, K.; NAGAHAMA, H.; MINAMISHIMA, Y. A.; MATSUMOTO, M.; NAKAMICHI, I.; KITAGAWA, K.; SHIRANE, M.; TSUNEMATSU, R.; SUKIYAMA, T.; ISHIDA, N.; KITAGAWA, M.; NAKAYAMA, K.; HATAKEYAMA, S. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27 (Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. **EMBO J.**, v. 19, p. 2069–2081, 2000.
- NAWROCKI, S. T.; CAREW, J. S.; PINO, M. S.; HIGHSHAW, R. A.; DUNNER, K. Jr.; HUANG, P.; ABBRUZZESE, J. L.; MCCONKEY, D. J. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. **Cancer Res**, v. 65, p. 11658 – 11666, 2005.
- NIRMALA, P. B.; THAMPAN, R. V. Ubiquitination of the rat uterine oestrogen receptor – dependence on oestradiol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 213, p. 24–31, 1995.
- NISHIKAWA, H.; OOKA, S.; SATO, K.; ARIMA, K.; OKAMOTO, J.; KLEVIT, R. E.; FUKUDA, M.; OHTA, T. Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 3916-3924, 2003.
- NORBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Ann Rev Biochem**, v. 61, p. 441 – 470, 1992.
- OHTA, E; FUKUDA, M. Ubiquitin and breast cancer. **Oncogene**, v. 23, p. 2079–2088, 2004.
- ORLOWSKI, R. Z.; DEES, E. C. The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer: applying drugs that affect the ubiquitin-proteasome pathway to the therapy of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 5, p. 1 - 7, 2003.
- ORLOWSKI, M.; WILK, S. Catalytic Activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. **Arch Biochem Biophys**, v. 383 (1), p. 1 - 16, 2000.
- QUESNEL, B.; PREUDHOMME, C.; FOURNIER, J.; FENAUX, P.; PEYRAT, J. P. *MDM2* gene amplification in human breast cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 30A, p. 982 – 984, 1994.
- PALOMBELLA, V. J.; RANDO, O. J.; GOLDBERG, A. L.; MANIATIS, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing of NFκB1 precursor protein and the activation of NFκB. **Cell**, v. 78, p. 773-785, 1994.

- PARK, E. Y.; KIM, J. A.; KIM, H. W.; KIM, Y. S.; SONG, H. K. Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from barley seeds internary complex with porcine trypsin. **J. Mol. Biol.**, v. 343, p. 173 – 186, 2004.
- PEARCE, S. T.; LIU, H.; JORDAN, V. C. Modulation of Estrogen Receptor alpha Function and Stability by Tamoxifen and a Critical Amino Acid (Asp-538) in Helix 12. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 7630–7638, 2003.
- PETO, R.; BOREHAM, J.; CLARKE, M.; DAVIES, C.; BERAL, V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20–69 years. **Lancet**, v. 355 (9217), p. 1822, 2000.
- PICKART, C. M.; COHEN, R. E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, p. 177 – 187, 2004.
- PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 503 – 533, 2001.
- PINTO, A. E.; ANDRE, S.; LARANJEIRA, C.; SOARES, J. Correlations of cell cycle regulators (p53, p21, pRb and mdm2) and c-erbB-2 with biological markers of proliferation and overall survival in breast cancer. **Pathology**, v. 37, p. 45 – 50, 2005.
- PORTER, P. “Westernizing” women’s risks? Breast cancer in lower-income countries. **N Engl J Med**, v. 358, p. 213 – 16, 2008.
- PREISLER-MASHEK, M. T.; SOLODIN, N.; STARK, B. L.; TYRIVER, M. K.; ALARID, E. T. Ligand-Specific Regulation of Proteasome-Mediated Proteolysis of Estrogen Receptor- $\alpha$ . **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, p. E891–E898, 2002.
- PÜHLER, G.; WEINKAUF, S.; BACHMANN, L.; MÜLLER, S.; ENGEL, A.; HEGERL, R.; BAUMEISTER, W. Subunit stoichiometry and three dimensional arrangement in proteasome from *Termoplasma acidophilum*. **EMBO J**, v. 11 (4), p. 1607 - 1616, 1992.
- RAJKUMAR, S. V.; RICHARDSON, P. G.; HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. C. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23 (3), p. 630 - 639, 2005.
- RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicol**, v. 39, p. 603 - 613, 2001.
- RAVDIN, P. M.; CRONIN, K. A.; HOWLADER, N.; BERG, C. D.; CHLEBOWSKI, R. T.; FEUER, E. J.; EDWARDS, B. K.; BERRY, D. A. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. **N Engl J Med**, v. 356, p. 1670 – 74, 2007.
- RAVID, T.; HOCHSTRASSER, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin–proteasome system. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 679 – 689, 2008.
- RECHSTEINER, M.; HILL, C. P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. **TRENDS in Cell Biology**, v. 15, p. 27 – 33, 2005.
- RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. **Food Chem.**, v. 6, p. 235 – 253, 1981.
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry**, v. 16, p. 159 - 69, 1977.
- RICHARDSON, P. G.; MITSIADES, C.; HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. C. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. **Annu Rev Med**, v. 57, p. 33 - 47, 2006.
- RICHARDSON, P. G. ; BARLOGIE, B. ; BERENSON, J. SINGHAL, S. ; JAGANNATH, S. ; IRWIN, D. ; RAJKUMAR, S. V. ; SRKALOVIC, G. ; ALSINA, M.; ALEXANIAN, R.; SIEGEL, D.; ORLOWSKI, R. Z.; KUTER, D.; LIMENTANI, S. A.; LEE, S.; HIDESHIMA, T.; ESSELTINE, D.

- L.; KAUFFMAN, M.; ADAMS, J.; SCHENKEIN, D. P.; ANDERSON, K. C. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. **N Engl J Med**, v. 348, p. 2609 – 2617, 2003.
- RIVETT, A. J. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. **Biochem J**, v. 291, p. 1 - 10, 1993.
- ROBSON, M.; OFFIT, K. Clinical practice. Management of an inherited predisposition to breast cancer. **N Engl J Med**, v. 357, p. 154 – 162, 2007.
- ROCK, K. L.; YORK, I. A.; SARIC, T.; GOLDBERG, A. L. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. **Adv. Immunol**, v. 80, p. 1 – 70, 2002.
- ROCK, K. L.; GRAMM, C.; ROTHSTEIN, L.; CLARK, K.; STEIN, R.; DICK, L.; HWANG, D.; GOLDBERG, A. L. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell**, v. 78, p. 761 – 771, 1994.
- ROCK, K. L.; GOLDBERG, A. L. Role of proteasomes in antigen presentation. **Enzyme Protein**, v. 47, p. 354 - 369, 1993.
- RÜCKRICH, T.; KRAUS, M.; GOGEL, J.; BECK, A.; OVAA, H.; VERDOES, M.; OVERKLEEF, H. S.; KALBACHER, H.; DRIESSEN, C. Characterization of the ubiquitin–proteasome system in bortezomib-adapted cells. **Leukemia**, v. 23, p. 1098 – 1105, 2009.
- RUFFNER, H.; JOAZEIRO, C. A.; HEMMATI, D.; HUNTER, T.; VERMA, I. M. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, p. 5134 – 5139, 2001.
- RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annu Rev Phytol**, v. 28, p. 425 – 449, 1991.
- RYAN, C. A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol.**, v. 24, p. 173 – 196, 1973.
- SAITO, T.; SATO, H.; VIRGONA, N.; HAGIWARA, H.; KASHIWAGI, K.; SUZUKI, K.; ASANO, R.; YANO, T. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. **Cancer Lett**, v. 253, p. 249 – 257, 2007.
- SCHAUBER, C.; CHEN L.; TONGAONKAR, P.; VEGA, I.; LAMBERTSON, D.; POTTS, W.; MADURA, K. Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. **Nature (London)**, v. 391, p. 715 – 718, 1998.
- SCHEFFNER, M.; MÜNGER, K.; HUIBREGTSE, J. M.; HOWLEY, P. M. Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins. **EMBO J**, v. 11 (7), p. 2425 - 2431, 1992.
- SCHMIDTKE, G.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; HENKLEIN, P.; FRÖMMEL, C.; LÖWE, J.; HUBER, R.; KLOETZEL, P. M.; SCHMIDT, M. Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. **The EMBO journal**, v. 15, p. 6887-6898, 1996.
- SCHULER, H. T.; POPPY, M. G.; DENHOLM, L. Insect-resistant transgenic plants. **Trends Biotechnol**, v. 16, p. 168 – 174, 1998.
- SEEGER, M.; FERRELL, K.; FRANK, R.; DUBIEL, W. HIV-1 Tat inhibits the 20S proteasome and its 11S regulator-mediated activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272 (13), p. 8145 - 8148, 1997.

SEEMÜLLER, E.; LUPAS, A.; STOCK, D.; LÖWE, J.; HUBER, R.; BAUMEISTER, W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. **Science**, v. 268, p. 79 – 582, 1995.

SEEMÜLLER, E.; LUPAS, A.; BAUMEISTER, W. Autocatalytic processing of the 20S proteasome. **Nature (London)**, v. 382, p. 468 – 471, 1996.

SEMPLE, C. A.; RIKEN GER Group; GSL Members. The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. **Genome Res**, v. 13, p. 1389 – 1394, 2003.

SHERR, C.J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev**, v. 13, p. 1501 – 1512, 1999.

SIERRA, A. Metastases and their microenvironment: linking pathogenesis and therapy. **Drug Resist Updates**, v. 8, p. 247 – 257, 2005.

SIGNORETTI, S.; DI MARCOTULLIO, L.; RICHARDSON, A.; RAMASWAMY, S.; ISAAC, B.; RUE, M.; MONTI, F.; LODA, M.; PAGANO, M. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 633–641, 2002.

SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M. Oligomerization States of Bowman-Birk Inhibitor by Atomic Force Microscopy and Computational Approaches. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 61, p. 642 – 648, 2005.

SILVA, L. P.; LEITE, J. R. S. A.; BLOCH, C.; FREITAS, S. M. Stability of a Black Eyed Pea Trypsin/Chymotrypsin inhibitor (BTCI). **Protein and Peptide Lett**, v. 8, p. 33 – 38, 2001.

SKOWYRA, D.; CRAIG, K. L.; TYERS, M.; ELLEDGE, S. J.; HARPER, J. W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. **Cell**, v. 91, p. 209-219, 1997.

SMITH, L. F. Palpable cancer of the breast and negative mammography: the ongoing dilemma. **J Surg Oncol**, v. 96, p. 451 – 452, 2007.

SOLIGO, D.; SERVIDA, F.; DELIA, D.; FONTANELLA, E.; LAMORTE, G.; CANEVA, L.; FUMIATTI, R.; LAMBERTENGI DELILIERI, G. The apoptogenic response of human myeloid leukaemia cell lines and of normal and malignant haematopoietic progenitor cells to the proteasome inhibitor PSI. **Br J Haematol**, v. 113, p. 126 – 135, 2001.

SUN, Y. Targeting E3 Ubiquitin Ligases for Cancer Therapy. **Cancer Biology & Therapy**, v. 2 (6), p. 623 - 629, 2003.

SUTTERLÜTY, H.; CHATELAIN, E.; MARTI, A.; WIRBELAUER, C.; SENFTEN, M.; MÜLLER, U.; KREK, W. P45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. **Nat Cell Biol**, v. 1, p. 207-214, 1999.

TAMURA, T.; NAGY, I.; LUPAS, A.; LOTTSCHEICH, F.; CEJKA, Z.; SCHOOF, G.; TANAKA, K.; DE MOT, R.; BAUMEISTER, W. The first characterization of eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. **Curr Biol**, v. 5, p. 766 - 774, 1995.

TAN, P.; CADY, B.; WANNER, M.; WORLAND, P.; CUKOR, B.; MAGI-GALLUZZI, C.; LAVIN, P.; DRAETTA, G.; PAGANO, M.; LODA, M. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. **Cancer Res**, v. 57, p. 1259 – 1263, 1997.

TANAKA, K.; KASAHARA, M. The MHC class I ligand-generating system: roles of Immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. **Immunol. Rev**, v. 163, p. 161 – 176, 1998.

- TANAKA, K.; YOSHIMURA, T.; KUMATORI, A.; ICHIHARA, A.; IKAI, A.; NISHIGAI, M.; KAMEYAMA, K.; TAKAGI, T. Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. **J Biol Chem**, v. 263 (31), p. 16209 – 16217, 1988.
- TANG, M.; ASAMOTO, M.; OGAWA, K.; NAIKI-ITO, A.; SATO, S.; TAKAHASHI, S.; 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. **Pathol Int**, v. 59, p. 790 – 796, 2009.
- TARDIOLI, S.; BONINCONTRO, A.; MESA, C. L.; MUZZALUPO, R. Interaction of bovine serum albumin with gemini surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 347 (1), p. 96 – 101, 2010.
- THOMAS, A. R.; OOSTHUIZEN, V.; NAUDÉ, R. J.; MURAMOTO, K. Purification and characterization of the 20S proteasome from ostrich skeletal muscle. **Biol Chem.**, v. 383 (7 - 8), p. 1267 – 1270, 2002.
- TOUIL, T.; CIRIC, B.; VENTURA, E.; SHINDLER, K. S.; GRAN, B.; ROSTAMI, A. Bowman-Birk Inhibitor Suppresses Autoimmune Inflammation and Neuronal Loss in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. **J Neurol Sci.**, v. 271 (1-2), p. 191 – 202, 2008.
- TRAUB, F.; MENGEL, M.; LUCK, H. J.; KREIPE, H. H.; WASIELEWSKI, R. Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 99, p. 185 – 191, 2006.
- TROLL, W.; WIESNER, R.; FRENKEL, K. Anticarcinogenic action of protease inhibitors. **Adv. Cancer Res.**, v. 49, p. 265 – 283, 1987.
- VARSHAVSKY, A. Regulated protein degradation. **Trends Biochem Sci**, v. 30, p. 283 – 286, 2005.
- VASSILEV, L. T.; VU, B. T.; GRAVES, B.; CARVAJAL, D.; PODLASKI, F.; FILLIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E. A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science**, v. 303, p. 844 – 848, 2004.
- VENKITARAMAN, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, v. 108, p. 171 – 182, 2002.
- VENTURA, M. M.; MIZUTA, K.; IKEMOTO, H. Solvent perturbation and surface accessibility of the tryptophyl and tyrosyl groups in black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. **An Acad Bras Cienc**, v. 56, p. 217 – 220, 1984.
- VENTURA, M. M.; MIZUTA, K.; IKEMOTO, H. Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution - a study by light-scattering. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 53, p. 195 – 201, 1981.
- VENTURA, M. M.; MARTIN, C. O.; MORHY, L. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.). VI. Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin. **An Acad Brasil Cienc**, v. 47, p. 335 – 346, 1975.
- VENTURA, M. M.; XAVIER-FILHO, J. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*V. Sinensis* L.) I. Purification and partial characterization. **An Acad Bras Cienc**, v. 38, p. 553 – 566, 1966.
- VIJAY-KUMAR, S.; BUGG, C. E.; COOK, W. J. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. **J Mol Biol**, v. 194 (3), p. 531 – 544, 1987.
- VITA, C. Engineering novel proteins by transfer of active sites to natural scaffolds. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 429 - 434, 1997.



- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. p53 function and dysfunction. **Cell**, v. 70, p. 523 - 526, 1992.
- VOGES, D.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 1015 – 10168, 1999.
- VOORHEES, P. M.; DEES, E. C.; O'NEIL, B.; ORLOWSKI, R. Z. The Proteasome as a Target for Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 6316 – 6325, 2003.
- VOSS, R. H.; ERMILER, U.; ESSEN, L. O.; WENZL, G.; KIM, Y. M.; FLECKER, P. Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28 nm resolution. Structural peculiarities in a folded protein conformation. **Eur. J. Biochem.**, v. 242, p. 122 – 131, 1996.
- WAN, X. S.; LU, L. W.; ANDERSON, K. E.; WARE, J. H.; KENNEDY, A. R. Urinary Excretion of Bowman-Birk Inhibitor in Humans after Soy Consumption as Determined by a Monoclonal Antibody-based Immunoassay. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 741 – 747, 2000.
- WAN, X. S.; HAMILTON, T. C.; WARE, J. H.; DONAHUE, J. J.; KENNEDY, A. R. Growth inhibition and cytotoxicity induced by Bowman-Birk inhibitor concentrate in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. **Nutr Cancer**, v. 31, p. 8 - 17, 1988.
- WANG, H.; NAN, L.; YU, D.; AGRAWAL, S.; ZHANG, R. Antisense Anti-MDM2 Oligonucleotides As a Novel Therapeutic Approach to Human Breast Cancer: *In Vitro* and *In Vivo* Activities and Mechanisms. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 3613 – 3624, 2001.
- WANG, T. C.; CARDIFF, R. D.; ZUCKERBERG, L.; LEES, E.; ARNOLD, A.; SCHMIDT, E. V. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-Cyclin D1 transgenic mice. **Nature**, v. 369, p. 669-671, 1994.
- WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, p. 169 – 178, 2001.
- WEISSMAN, J. S.; SIGLER, P. B.; HORWICH, A. L. From the cradle to the grave: ring complexes in the life of a protein. **Science**, v. 268, p. 523 - 524, 1995.
- WENZEL, H. R.; TSCHESCHE, H. *In Peptides: Synthesis, Structures, and Applications*; Gutte, B., Ed.; **Academic Press: San Diego, CA**, p 321 – 362, 1995.
- WILSON, H. L.; ALDRICH, H. C.; MAUPIN-FURLOW, J. Halophilic 20S proteasomes of the archaeon *Haloferax volcanii*: purification, characterization, and gene sequence analysis. **J Bacteriol.**, v. 181 (18), p. 5814 – 5824, 1999.
- WOJCIK, C.; DEMARTINO, G. N. Intracellular localization of proteasomes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, p. 579 – 589, 2003.
- WU, L. C.; WANG, Z. W.; TSAN, J. T.; SPILLMAN, M. A.; PHUNG, A.; XU, X. L.; YANG, M. C.; HWANG, L. Y.; BOWCOCK, A. M.; BAER, R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. **Nat. Genet.**, v. 14, p. 430–440, 1996.
- WU-BAER, F.; LAGRAZON, K.; YUAN, W.; BAER, R. The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 34743–34746, 2003.
- XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 4 (1), p. 1 – 6, 1992.
- XAVIER-FILHO, J.; VENTURA, M. M. Trypsin inhibitors in Cowpea: a review. **Comments Agric Food Chem**, v. 1, p. 239 – 314, 1988.

- XIA, Y.; PAO, G. M.; CHEN, H. W.; VERMA, I. M.; HUNTER, T. Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 5255–5263, 2003.
- XU, Q.; FARAH, M.; WEBSTER, J. M.; WOJCIKIEWICZ, R. J. H. Bortezomib rapidly suppresses ubiquitin thiolesterification to ubiquitin-conjugating enzymes and inhibits ubiquitination of histones and type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **Mol Cancer Ther.**, v. 3 (10), p. 1263 – 1269, 2004.
- XU, B.; KIM, S.; KASTAN, M. B. Involvement of *Brca1* in S-phase and G2-phase checkpoints after ionizing irradiation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 21, p. 3445 – 3450, 2001.
- YANG, Y.; FRÜH, K.; AHN, K.; PETERSON, P.A. *In vivo* assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. **J Biol Chem**, v. 270 (46), p. 27687- 27694, 1995.
- YAVELOW, J.; COLLINS, M.; BIRK, Y.; TROLL, W.; KENNEDY, A. R. Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, p. 5395 – 5399, 1985.
- YOSHIMURA, T.; KAMEYAMA, K.; TAKAGI, T.; IKAI, A.; TOKUNAGA, F.; KOIDE, T.; TANAHASHI, N.; TAMURA, T.; CEJKA, Z.; BAUMEISTER, W.; TANAKA, K.; ICHIHARA, A. Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. **J. Struct Biol.**, v. 111 (3), p. 200 – 211, 1993.
- ZHANG, H.; KOBAYASHI, R.; GALAKTIONOV, K.; BEACH, D. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. **Cell**, v. 82, p. 915–925, 1995.
- ZHENG, N.; SCHULMAN, B. A.; SONG, L.; MILLER, J. J.; JEFFREY, P. D.; WANG, P.; CHU, C.; KOEPP, D. M.; ELLEDGE, S. J.; PAGANO, M.; CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W.; HARPER, J. W.; PAVLETICH, N. P. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. **Nature**, v. 416, p. 703–709, 2002.
- ZHU, G.; HUANG, Q.; ZHU, Y.; LI, Y.; CHI, C.; TANG, Y. X-Ray study on an artificial mung bean inhibitor complex with bovine  $\beta$ -trypsin in neat cyclohexane. **Biochim Biophys Acta**, v. 1546, p. 98 – 106, 2001.