



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ADRIANNE MAIA LIMA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO CITOTÓXICO DE UM INIBIDOR
DE TRIPSINA ISOLADO DAS FOLHAS DE *Morinda citrifolia* L. EM LINHAGENS
DE CÉLULAS CANCERÍGENAS HUMANAS**

FORTALEZA

2020

ADRIANNE MAIA LIMA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO CITOTÓXICO DE UM INIBIDOR DE
TRIPSINA ISOLADO DAS FOLHAS DE *Morinda citrifolia* L. EM LINHAGENS DE
CÉLULAS CANCERÍGENAS HUMANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação Universidade
Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L696i Lima, Adrienne Maia.
Isolamento, caracterização e efeito citotóxico de um inibidor de tripsina isolado das folhas de *Morinda citrifolia* L. em linhagens de células cancerígenas humanas / Adrienne Maia Lima. – 2020.
61 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
1. Câncer. 2. Citotoxicidade. 3. Inibidores de proteases. 4. *Morinda citrifolia*. 5. Proteínas vegetais. I. Título.

CDD 572

ADRIANNE MAIA LIMA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO CITOTÓXICO DE UM INIBIDOR DE
TRIPSINA ISOLADO DAS FOLHAS DE *Morinda citrifolia* L. EM LINHAGENS DE
CÉLULAS CANCERÍGENAS HUMANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovação em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Carolina de Araújo Viana
Centro Universitário UniFanor Wyden (UniFanor)

À minha família e todos aqueles que tornaram
esta jornada possível.

AGRADECIMENTOS

À minha família e meu namorado, Thalesson Cláudio, por todo amor, apoio, suporte e incentivo, os quais me fizeram perseverar na busca dos meus objetivos.

Ao meu orientador, Professor Hermógenes David de Oliveira, por ter me aceitado mais uma vez como sua orientanda e que foi peça chave na conquista da minha graduação e mestrado. Obrigada por acreditar no meu potencial e pelos conselhos, assim como pelas cobranças que me fizeram crescer como aluna e como pessoa.

A todos os estudantes que compõem o Laboratório de Química Medicinal, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos - NPDM da UFC. Sem toda a ajuda que recebi de cada um de vocês, este trabalho não existiria. Um obrigado especial para os amigos Vilmara Farias, Rodolpho Guedes, Andréa Costa e Cristiane Nogueira.

Agradeço também ao meu amigo, Adson Ávila, por todas as conversas, ideias, explicações e companheirismo que foram imprescindíveis para a construção deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC, em especial, para a Professora Maria Elisabete Amaral de Moraes, pela acolhida no Laboratório de Química Medicinal e por todo o suporte dado para a realização deste projeto de pesquisa.

À Profa. Dra. Raquel Montenegro e aos estudantes Felipe Mesquita, Emerson Lucena e todos que compõem o Laboratório de Farmacogenética, pela parceria e disponibilidade, especialmente nos ensaios de avaliação da citotoxicidade.

Às funcionárias do NPDM Ivaneide Ferreira e Simone Pereira, que se mostraram sempre dispostas a me ajudar e que hoje são minhas amigas.

Aos amigos de diversos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (Bloco 907) da UFC, que me ajudaram e tornaram várias etapas desse trabalho possíveis.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC, que tornaram possível a minha formação e me mostraram o quão inspiradoras são a ciência e a pesquisa, mesmo em tempos tão difíceis.

Aos meus amigos do curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, que me acompanharam até a pós-graduação, Mayara Azevedo, Misrael Sales e Nadine Salgueiro, pelos anos que passamos juntos, estudando e nos divertindo.

À UFC, por oferecer um ensino de qualidade com professores altamente capacitados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado. À FUNCAP e CAPES pelo auxílio financeiro concedido por meio de financiamento de projetos de pesquisa.

“São as nossas escolhas, Harry, que revelam o que realmente somos, muito mais do que as nossas qualidades.” (ROWLING, 2000, p. 280).

RESUMO

Inibidores de proteases (IPs) são moléculas ubíquas, capazes de regular a atividade de diversas proteases envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. A literatura tem reportado diversos IPs com potencial terapêutico contra doenças cardiovasculares, inflamatórias e câncer. Recentemente, nosso grupo de pesquisa divulgou o isolamento, a partir das folhas de *Morinda citrifolia* L. (noni), de um inibidor de tripsina (NLTI, do inglês, Noni Leaf Trypsin Inhibitor), cujas características bioquímicas e efeitos terapêuticos eram desconhecidos até então. Este trabalho objetivou caracterizar estrutural e funcionalmente NLTI, bem como avaliar seus efeitos sobre linhagens de células cancerígenas humanas *in vitro*. NLTI foi purificado a partir das folhas de noni por meio de tratamento térmico dos extratos proteicos obtidos e de cromatografia de afinidade (Tripsina-Sepharose 4B). Aspectos bioquímicos de NLTI, tais como suas propriedades cinéticas e estabilidade da atividade antitriptica, foram investigados. O potencial citotóxico foi avaliado por meio de ensaios fluorimétricos utilizando o reagente alamarBlue sobre linhagens de células de adenocarcinoma gástrico (AGP01), carcinoma de língua (CAL-27), melanoma humano (SK-MEL-103), carcinoma colorretal (HCT 116) e em linhagem eritroleucêmica (K-562). Adicionalmente, o efeito citotóxico foi investigado em linhagem de fibroblastos humanos normais (MRC-5). NLTI, após as etapas de purificação, apresentou atividade inibitória específica de 15.400 UI.mg⁻¹, índice de purificação de 83,74 vezes e rendimento de 0,012%. NLTI é uma glicoproteína de massa molecular aparente de 16 000 Da. NLTI foi capaz de inibir tripsina e papaína, mas foi menos eficaz contra quimotripsina. NLTI possui inibição do tipo mista sobre tripsina bovina (CI₅₀ de 16 x 10⁻⁹ M), com Ki de 1,69 x 10⁻⁹ M. A atividade antitriptica de NLTI não foi perdida, mesmo quando o inibidor foi submetido a uma ampla faixa de pH (2,0-10,0; 30 min), temperatura (100 °C; 120 min) e à presença de agente redutor (DTT 100 mM; 120 min). Entretanto, na presença do íon metálico Fe³⁺ (10 mM; 30 min), houve redução de 16% em sua atividade. NLTI (1 µM), após incubação por 72 horas, foi capaz de reduzir significativamente (p<0,05) a viabilidade celular das linhagens K-562 (42,43 ± 2,34%), HCT 116 (34,84 ± 0,31%), CAL-27 (12,35 ± 0,14%) e MRC-5 (16,20 ± 0,95%). Doxorrubicina (10 µM) foi utilizada como controle positivo. Os resultados obtidos sugerem que NLTI possui potencial citotóxico e dão suporte para realização de ensaios *in vivo*, objetivando verificar o seu potencial terapêutico futuro.

Palavras-chave: Câncer. Citotoxicidade. Inibidores de proteases. *Morinda citrifolia*. Proteínas vegetais.

ABSTRACT

Protease inhibitors (PIs) are ubiquitous molecules capable of regulating the activity of various proteases involved in physiological and pathological processes. Several PIs with therapeutic potential against cardiovascular, inflammatory, and cancer diseases have already been reported in the literature. Recently, our research group isolated a trypsin inhibitor (here named as NLTI, Noni Leaf Trypsin Inhibitor), from *Morinda citrifolia* L. (noni) leaves whose biochemical characteristics and therapeutic effects are unknown. This work aimed to characterize structurally and functionally NLTI, as well as to evaluate its effects on human cancer cell lines *in vitro*. NLTI was purified from noni leaves by heat treatment of the protein extracts obtained and affinity chromatography (Trypsin-Sepharose 4B). Biochemical aspects of NLTI, such as its kinetic properties and stability of antitryptic activity, were investigated. The cytotoxic potential was evaluated by *in vitro* assays using alamarBlue reagent on the following cell lines: gastric adenocarcinoma (AGP01), tongue carcinoma (CAL-27), human melanoma (SK-MEL-103), colorectal carcinoma (HCT 116) and erythroleukemic (K-562) cell lines. Additionally, the cytotoxic effect was investigated in normal human fibroblast cell line (MRC-5). After purification steps, NLTI show a specific activity of 15 400 IU.mgP⁻¹, 83.74 fold purification and 0.012% yield. NLTI is a glycoprotein with an apparent molecular mass of 16 000 Da. NLTI demonstrated a mixed-type inhibition on bovine trypsin (IC₅₀ 16 x 10⁻⁹ M) with Ki of 1.69 x 10⁻⁹ M. NLTI antitrypsin activity was not lost even when the inhibitor was subjected to a wide pH range (2.0-10.0; 30 min), temperature (100 °C; 120 min) and on the presence of reducing agent (100 mM DTT; 120 min). However, in the presence of Fe³⁺ metal ion (10 mM; 30 min), there was a 16% reduction in its activity. NLTI (1 μM), after incubation of 72 h, was able to reduce (p <0.05) cell viability of K-562 (42.43 ± 2.34%), HCT 116 (34.84 ± 0.31%), CAL-27 (12.35 ± 0.14%) and MRC-5 (16.20 ± 0.95%). Doxorubicin (10 μM) was used as positive control. The results suggest that NLTI has cytotoxic potential and support *in vivo* assays, aiming to verify its future therapeutic application.

Keywords: Cancer. Cytotoxicity. *Morinda citrifolia* L. Plant proteins. Protease inhibitors.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação da estrutura tridimensional de famílias de inibidores de proteases de plantas.....	16
Figura 2 –	Representação esquemática dos principais efeitos farmacológicos de inibidores de proteases de plantas.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classes e famílias de inibidores de proteases de plantas.....	15
------------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Inibidores de proteases	14
1.2	Potencial terapêutico dos inibidores de proteases no tratamento do câncer	17
1.3	<i>Morinda citrifolia</i> L.	20
2	HIPÓTESE	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	Geral:	24
3.2	Específicos:	24
4	ARTIGO DA DISSERTAÇÃO	25
5	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	58