



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Atividade inibidora de proteases de *Cajanus cajan* (L.) Millsp e seu efeito sobre proteases secretadas de células de melanoma

Érika Maria Gomes Ferreira Teixeira^{1,2}, Karine Fernandes Telles^{1,2}, Rayane Natashe¹
Gonçalves, André Sampaio¹ e Raquel Elisa da Silva López¹

¹Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - Farmanguinhos – Departamento de Química de Produtos Naturais - Grupo de Bioquímica de Proteases e Inibidores de Proteases de Origem Natural – Avenida Brasil, 4365 CEP 21045-900 – Rio de Janeiro – RJ

²Universidade Federal do Rio de Janeiro – Faculdade de Farmácia - Centro de Ciências da Saúde – CCS - Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Rio de Janeiro - RJ

RESUMO

Os inibidores de proteases (IPs) estão presentes em todos os organismos vivos regulando a atividade das enzimas proteolíticas e os de plantas, são os mais estudados da natureza. *Cajanus cajan* é uma leguminosa originária da África tropical ocidental, muito consumida na Ásia, África e América devido ao seu grande teor de proteínas. É utilizada para o tratamento da diabetes, feridas, irritações da pele, hepatite, malária, anemias, sarampo, icterícia, disenteria dentre outros usos. Além disso, possui efeito anticâncer, o qual nunca foi correlacionado à sua atividade inibidora de proteases. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de IPs em extratos aquosos desta planta medicinal. Para isso, utilizamos extratos aquosos de folha, raiz e caule de *C. cajan* e estudamos seu perfil de proteínas, bem como sua atividade inibitória contra proteases de referência e proteases secretadas de duas linhagens de células de melanoma: SK-MEL-28 e MV3. O extrato de caule apresentou o maior teor de proteínas, contudo seu perfil eletroforético demonstrou baixa diversidade proteica. Comportamento semelhante foi observado nos extratos de raiz. Já os extratos de folha apresentaram várias proteínas com massas entre 270 a 25 kDa. Os extratos de *Cajanus* inibiram de modo diferenciado tripsina, papaína e pepsina e, também, as proteases secretadas pelas células de melanoma. A melhor atividade de IPs foi obtida pelos extratos de folha e sobre as proteases de SK-MEL-28, que por sua vez exibiu menor atividade proteolítica que MV3. Estes resultados indicaram que *C. cajan* possui IPs do tipo tripsina, pepsina e papaína que foram capazes de inibir as proteases secretadas de células de melanoma e, portanto, estes inibidores podem constituir potenciais agentes anticâncer.

Palavras chaves: *Cajanus cajan*, inibidor de proteases, proteases secretadas, melanoma, SKmel, viabilidade.

INTRODUÇÃO

Cajanus cajan, vulgarmente conhecido como feijão-guandu, ervilha-de-pombo, guandu, poroto, falso café, arveja, frijol de árbol, Cumandái, arhar, dahl, catjang, pigeon pea, angola pea, pois d'angole e Puerto Rican bean, é uma leguminosa arbustiva que tem origem na África tropical ocidental e é largamente cultivado na Índia desde a Antiguidade.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A partir de sua domesticação a cerca de 4.000 anos atrás, suas sementes são consumidas pelo seu grande teor de proteínas. Na Índia, além de ser a base da alimentação, suas folhas são usadas para a criação de bichos da seda. É usado como silagem, pastejo e como adubo verde por ser excelente fixador de nitrogênio.

Na medicina tradicional chinesa *C. cajan* é indicado no alívio da dor e como sedativo. Tem sido amplamente utilizado há muitos anos para o tratamento da diabetes, feridas, irritações da pele, hepatite, malária, anemias, sarampo, icterícia, disenteria, dentre outros empregos. Também foi reportado que esta planta apresenta importante atividade anticâncer que é atribuída à presença de flavonoides, isoflavanonas e estilbenos extraídos de folhas, sementes e raízes. Contudo, este efeito anticâncer nunca foi correlacionado à sua atividade IPs. É sabido que as células tumorais secretam proteases para o meio extracelular, com os objetivos de hidrolisar proteínas de matriz extracelular e facilitar a invasão pelos tecidos do hospedeiro, liberar fatores de crescimento, regular a angiogênese garantindo o crescimento e a viabilidade tumoral. Sendo assim, os IPs interferem na progressão de tumores e constituem importantes estratégias para o controle da doença. É sabido que alguns IPs de leguminosas, como o inibidor de tripsina da soja, têm sido empregados com sucesso no tratamento de adenocarcinomas de mama e cólon. Portanto, os objetivos deste trabalho foram estudar a atividade de IPs de extratos aquosos de folha, caule e raiz de *Cajanus cajan* e se a presença destes IPs interfere na atividade das proteases secretadas por células de linhagem de melanoma MV3 e SK-MEL-28.

MATERIAL E MÉTODOS

Os órgãos de *Cajanus cajan* foram coletados às 10 h da manhã em dia ensolarado na Plataforma Agroecológica da FIOCRUZ e sua excisada depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o registro RB-495.437.

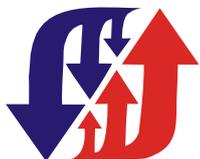
Os sobrenadantes de cultura das células das linhagens de melanoma MV3 e SKMEL- 28 foram cedidos pelo laboratório de Farmacologia Molecular da FIOCRUZ. Eles foram centrifugados à 10.000 x g/ 30 min a 4°C e liofilizados para posterior uso nos ensaios de inibição com as proteases secretadas.

Os órgãos frescos de *Cajanus cajan* foram lavados com água destilada e processados imediatamente. As folhas foram pulverizadas em nitrogênio líquido e suas proteínas extraídas por 2h à temperatura ambiente em agitação leve usando água, tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 ou tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5. Já o caule e as raízes foram triturados em liquidificador e suas proteínas foram extraídas com água.

Após o tempo de extração o material proveniente de cada órgão foi centrifugado a 10.000 x g/ 30 min a 4°C, obtendo-se respectivamente os extratos CC-A, CC-T, CC-P de folhas e CC-CA de caule e CC-RA de raiz.

O teor de proteínas dos extratos e dos sobrenadantes de cultura das linhagens das células tumorais foi mensurado pelo reativo de Bradford, usando a albumina de soro bovino como padrão.

Os extratos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia descrita por Laemmli, para avaliar o perfil de proteínas.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A atividade das proteases dos sobrenadantes de cultura foi avaliada através da progressão da atividade em um ensaio com o substrato L-TAME, onde a atividade foi dosada em espectrofotômetro a 247nm, sendo avaliado de cinco em cinco minutos até 30 minutos.

A atividade de IPs dos extratos foi estudada usando tripsina, papaína e pepsina como enzimas de referência representantes das classes das serino, cisteíno e aspárticoproteases respectivamente. Os extratos foram incubados com as enzimas durante 45 minutos nos tampões específicos de cada enzima, que são respectivamente: Tris HCl 50 mM pH 8.5, fosfato de sódio 50 mM pH 6.5 e acetato de sódio 50 mM pH 4.5. A reação foi iniciada com a adição do substrato caseína (0,5 mg/ml) e ocorreu durante 45 minutos. Esta foi paralisada com ácido tricloroacético 10% e centrifugada por 10 minutos a 10.000 x g à 4°C. A absorvância do sobrenadante foi quantificada em espectrofotômetro à 280nm. O resultado foi expresso em atividade residual enzimática em relação à atividade controle sem a adição dos extratos.

A atividade inibidora dos extratos também foi ensaiada contra as proteases secretadas por células tumorais. Dez µg de proteína dos extratos foram incubados com a mesma quantidade de proteína dos sobrenadantes por 45 minutos em tampão Tris HCl 50 mM pH 7.0 para ambos os sobrenadantes antes da adição do substrato. Após os 45 minutos foi adicionado o substrato, a caseína, e a reação transcorreu por 45 minutos. A reação foi paralisada com ácido tricloroacético 10%, e em seguida centrifugada por 10 minutos a 10.000 x g/ 4°C e o sobrenadante quantificado em espectrofotômetro a 280nm. Em paralelo foram feitos ensaios 100% onde foi vista a atividade das enzimas dos sobrenadantes na ausência dos inibidores. A inibição foi expressa em porcentagem quando comparada à atividade dos ensaios 100%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de caule aquoso (CC-CA) apresentou o maior teor proteico, enquanto que o menor foi observado para o extrato de raiz (CC-RA). Já o sobrenadante de SKMEL-28 foi encontrado maior teor proteico do que MV3, embora este último tenha apresentado maior atividade de proteases.

Os extratos de folha apresentaram perfil de proteínas em SDS-PAGE muito semelhantes entre si, com bandas de proteínas majoritárias entre 270 e 39 kDa. Os extratos de caule e raiz demonstraram um número muito menor de bandas de proteínas do que nos extratos de folha. O CC-CA apresentou proteínas com 55 kDa, 35 kDa e 30 kDa, já CC-RA exibiu proteínas com 70 kDa, 49kDa e 37 kDa de massa molecular aproximadamente.

A atividade IPs foi avaliada inicialmente contra tripsina, pepsina e papaína. Todos os extratos inibiram de modo diferenciado tais enzimas de referência, com exceção do CC-A que não inibiu nem a tripsina e nem a papaína. Contudo, a melhor inibição foi obtida com a papaína, uma enzima do mamão *Carica papaya*. É possível que esta enzima seja a cisteíno-protease mais adequada para testar IPs de plantas e que a tripsina e a pepsina bovinas, sejam mais adequadas para avaliar IPs de mamíferos. Contudo, tais enzimas são mais representativas de cada classe de proteases. Excelente inibição da papaína e da tripsina pôde ser observada por CC-P, CC-CA e CC-RA. A pepsina, foi a enzima menos afetada pelos extratos, contudo é sabido que na natureza os IPs de aspártico-proteases são os mais raros. Esses resultados sugerem a presença de IPs do tipo serino, cisteíno e aspártico-proteases em folha, caule e raiz de *C. cajanus*.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

As proteases secretadas por SK-MEL-28 foram mais sensíveis aos extratos de *C. cajan* do que as de MV3. Todos os cinco extratos foram capazes de inibir de modo diferenciado, a atividade das proteases secretadas de SK-MEL-28, sendo o que CC-P demonstrou o maior poder inibitório. Em relação às enzimas de MV3 apenas CC-A, CC-P e CC-CA possuíram algum efeito inibitório, sendo que a maior inibição foi obtida para o CC-A.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que os extratos de *Cajanus cajan* possuem IPs do tipo tripsina, papaína e pepsina. Tais inibidores foram capazes de inibir a atividade das proteases secretadas de células de linhagem de melanoma e como é sabido que as proteases são importantes fatores de virulência para as células tumorais, seus inibidores, portanto, podem constituir potenciais agentes anticâncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashidi JS, Houghton PJ, Hylands PJ, Efferth T. 2010. Ethnobotanical survey and cytotoxicity testing of plants of South-western Nigeria used to treat cancer, with isolation of cytotoxic constituents from *Cajanus cajan* Millsp. leaves. *J Ethnopharmacol.* 128:501-512.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 72:248-254.
- Clemente A, Arques MC. 2014. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World J Gastroenterol.* 20: 10305-10315.
- Fu Y, Kadioglu O, Wiench B, Wei Z, Wang W, Luo M, Yang X, Gu C, Zu Y, Efferth T. 2015. Activity of the antiestrogenic cajanin stilbene acid towards breast cancer. *Nutr Biochem.* 26:1273-1282.
- Haq SK, Khan RH. 2003. Characterization of a proteinase inhibitor from *Cajanus cajan* (L.) *J Protein Chem* 22:543-554.
- Hui H, Minjing L, Ting L, Yancun Y, Yangfu J. 2011. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cellular and molecular life sciences.* 68:3853-3868.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Pal D, Mishra P, Sachan N, Ghosh AK. Biological activities and medicinal properties of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. 2011. *J Adv Pharmaceutic Tech Res* 2:207-214.
- Swathi M, Lokya V, Swaroop V, Mallikarjuna N, Kannan M, Dutta-Gupta A, Padmasree K. 2014. Structural and functional characterization of proteinase inhibitors from seeds of *Cajanus cajan* (cv. ICP 7118). *Plant Physiol Biochem* 83:77-87.