

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
Beatriz da Silva Jacintho
Jullie Anne de Souza Coronel
Leonardo Nunes Ramos Moura
Simone de Oliveira Vargas

Estudo dos efeitos de EcTI (*Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor)
sobre linhagens de células potencialmente metastáticas.

Duque de Caxias -RJ

2020

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO

**Beatriz da Silva Jacintho
Jullie Anne de Souza Coronel**

Leonardo Nunes Ramos Moura

Simone de Oliveira Vargas

**Estudo dos efeitos de EcTI (*Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor)
sobre linhagens de células potencialmente metastáticas.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em ciências farmacêuticas da Universidade do Grande Rio.

Orientadora: Profa. Msc Simone Herdy

Duque de Caxias - RJ

2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Estudo dos efeitos de EcTI (*Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor)
sobre linhagens de células potencialmente metastáticas.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
curso de Farmácia, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em ciências
farmacêuticas da Universidade do Grande Rio.

Aprovada em _____ de _____ de 2020.

Banca Examinadora:

Professor 1

Professor 2

Orientador

Duque de Caxias- RJ

2020

Só se pode alcançar um grande
êxito quando nos mantemos
fiéis a nós mesmos.

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus pela oportunidade de estarmos realizando mais uma etapa de nossas vidas.

Aos nossos familiares por toda a paciência e dedicação para que o caminho se tornasse mais fácil e prazeroso durante todos esses anos.

Agradecemos imensamente aos nossos professores e a faculdade Unigranrio, que contribuíram muito para o nosso aprendizado e desenvolvimento, e também em especial a nossa querida orientadora Simone Herdy que nos permitiu fechar este ciclo de uma maneira satisfatória.

RESUMO

Com o intuito de se obter fármacos que possam atuar de forma mais eficaz e menos agressiva aos pacientes portadores do câncer, diariamente novas drogas são testadas ou tidas como solução para alguma das formas da doença. Frequentemente nos deparamos com possíveis soluções milagrosas ou de custo baixo, muitas destas sem qualquer teor científico. Por outro lado, diversas plantas têm sido estudadas há longos anos e são tidas como promissoras fontes de compostos para produção de fármacos no combate ao câncer e metástases. Pretende-se desta forma apresentar ativos extraídos de *Enterolobium contortisiliquum* que possam agregar resultados ao tratamento de câncer, descrever os mecanismos de ação das EcTI no combate a ações tumorais em diferentes linhagens celulares através da análise e exposição dos efeitos obtidos no tratamento de células metastáticas. Foi realizada análise de literatura em portais acadêmicos como Scielo, Google Acadêmico e Pubmed tendo como coorte o período compreendido entre os anos de 1996 e 2020, cujo a temática abordasse os termos *Enterolobium contortisiliquum*, inibidores de tripsina, metástases e tratamento com EcTI. À partir de *Enterolobium contortisiliquum*, uma planta comum em nosso país e chamada normalmente de tamboril ou orelha-de-macaco, foi extraído um potente inibidor de tripsina denominado “EcTI”, extraído principalmente das sementes da planta, cuja atuação principal é por bloquear integrinas que atuam na ativação de quinases Src e FAK para transdução de sinais que levam ao processo metastático. Foram observados resultados promissores e que estimulam novos estudos com EcTI demonstrando atuação sobre células de câncer gástrico, células de câncer de mama e no adenocarcinoma colorretal humano de linhagem HT29.

Palavras-chave: Câncer, Inibidor de tripsina, Metástase.

ABSTRACT

In order to obtain drugs that can act more effectively and less aggressively to cancer patients, daily new drugs are tested or seen as a solution to some of the forms of the disease. We are often faced with possible miraculous or low-cost solutions, many of which have no scientific content. On the other hand, several plants have been studied for many years and are seen as promising sources of compounds for the production of drugs to fight cancer and metastases. In this way, we intend to present assets extracted from *Enterolobium contortisiliquum* that can add results to the treatment of cancer, describe the mechanisms of action of EcTI in combating tumor actions in different cell lines through the analysis and exposure of the effects obtained in the treatment of metastatic cells. Literature analysis was carried out in academic portals such as Scielo, Google Acadêmico and Pubmed, with the cohort of the period between 1996 and 2020, whose theme addressed the terms *Enterolobium contortisiliquum*, trypsin inhibitors, metastases and treatment with EcTI. From *Enterolobium contortisiliquum*, a common plant in our country and usually called monkfish or monkey ear, a potent trypsin inhibitor called “EcTI” was extracted, extracted mainly from the plant's seeds, whose main activity is to block integrins that act in the activation of Src and FAK kinases to translate signals that lead to the metastatic process. Promising results have been observed that stimulate further studies with EcTI demonstrating performance on gastric cancer cells, breast cancer cells and in human colorectal adenocarcinoma of HT29 strain.

Key-words: Cancer, Trypsin inhibitor, Metastasis.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	8
2.OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3.METODOLOGIA.....	11
4.JUSITIFICATIVA	12
5. DESENVOLVIMENTO.....	13
5.1 Inibidores de proteinases.....	13
5.2 Extração do inibidor	14
5.3 Mecanismo de Ação.....	14
5.4 Atividade do inibidor sobre diferentes linhagens de células	16
6 CONCLUSÃO.....	19
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

1.INTRODUÇÃO

Em todo mundo, o câncer continua sendo um agravo importante à saúde pública, acarretando em um grande número de óbitos anualmente. Apesar da melhoria na expectativa de vida com redução das taxas de mortalidade e o envelhecimento da população mundial, em contraponto ao século passado, onde com o processo de industrialização, o aumento do consumo e modificações das condições de trabalho e hábitos alimentares, acarretaram grandes mudanças também nos padrões de saúde, novos caminhos começam a se descortinar (MENDES & VASCONCELLOS, 2015). Estas mudanças outrora denominadas “transição epidemiológica” consiste na reorganização mundial que modificaram os padrões de saúde-doença ficando caracterizada por um novo perfil de mortalidade, ocorrendo o aumento das taxas de doenças crônicas degenerativas, como o câncer, e diminuição de doenças infecciosas. Fato é que infelizmente, nos países da América Latina, esta transição ainda não se deu por completo, fato este comprovado pelo aparecimento de novas doenças e principalmente pelo ressurgimento de doenças já tidas como erradicadas, por exemplo, os casos de sarampo (PEREIRA, et al 2015).

Observamos no Brasil uma área de grande relevância para monitoramento da incidência de diversos tipos de câncer, tendo em vista que além das desigualdades sociais existentes na região, a distribuição destes tipos de câncer segue uma posição superior à encontrada nos países desenvolvidos (MS, 2018). Ao constataremos toda gravidade que se refere a este grupo de doenças genericamente denominadas de câncer e suas múltiplas faces, vemos diariamente que novas drogas são produzidas e testadas arduamente com intuito de se obter fármacos que possam atuar de forma mais eficaz e menos agressiva aos pacientes portadores desta moléstia. Rotineiramente são lançadas em redes sociais e até por parte da mídia, muitas vezes sem qualquer fundamentação científica, plantas milagrosas tratadas como a ‘cura definitiva’ e ‘barata’ do câncer. Por outro lado, diversas plantas têm sido estudadas há longos anos e são tidas como promissoras fontes de compostos para produção de fármacos no combate ao câncer e metástases. Dentre elas destacamos *Enterolobium contortisiliquum*, chamada de tamboril no Nordeste e mais conhecida como orelha-de-macaco no Rio de Janeiro (DE PAULA, 2012). Segundo Miranda, et al (2015) o gênero *Enterolobium* compreende diversas espécies nativas no Brasil, incluindo *E. contortisiliquum*, *E. timbouva*, *E.gummiferum* e *E. shombungkii*. *Enterolobium contortisiliquum*, são árvores com média de 20 a 35 metros de altura, conhecida popularmente como ximbuva, orelha de negro, orelha de macaco, timburí, tamboril, timbaíba, timbó, pacará e tamburé, sendo encontrada em diversas regiões do país, desde o Pará até o Rio Grande do

Sul.

Baseados na importância do conhecimento científico expresso pela farmacobotânica, pela biologia molecular e pela química analítica, optamos por analisar a importâncias das substâncias extraídas de *Enterolobium contortisiliquum* , denominadas EcTI (*Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor), ou seja com ação inibidora da tripsina.

Em estudos analisados, observamos que o início do interesse e investigações sobre os inibidores de protease oriundos de vegetais datam da década de 40 com os estudos de Kunitz que purificou pela primeira vez uma proteína da soja (*Glycine max*) , sendo seguido por Bowman e Birk , este último já nos anos 60, todos tendo como fonte a soja, todavia identificando na mesma , diferentes inibidores. Podemos observar ainda a presença de isoformas da mesma proteína extraída de sementes de leguminosas, especialmente proteínas de defesa em vários estudos publicados Os inibidores de tripsina são desde então observados em diversas plantas pertencentes a diferentes famílias vegetais (PAIVA *et al.*, 2006; SAMMOUR, 2006; SUN; WANG; NG, 2010; CLEMENTE *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Apresentar a *Enterolobium contortisiliquum* no tratamento de câncer e descrever os principais mecanismos de ação das EcTI no combate a ações tumorais em diversas linhagens celulares.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever um dos métodos de extração do inibidor à partir da matéria prima.
- Explicar o mecanismo de ação das EcTI.
- Apresentar os efeitos obtido no tratamento de células metastáticas com EcTI.

3.METODOLOGIA

Esse trabalho foi realizado através da análise de literatura em estudo retrospectivo, a partir de artigos publicados em sites acadêmicos como Scielo, Google Acadêmico, Capes e Pubmed. Como critério de inclusão foram utilizados artigos cujo a temática abordasse *Enterolobium contortisiliquum* , inibidores de tripsina , metástases e tratamento com EcTI publicados no período de 1996 a 2019, foram usados como critérios de exclusão estudos anteriores a 1996 e cuja temática não abrangesse estudos de inibidores de tripsina em espécies vegetais.

4.JUSITIFICATIVA

O câncer pertence a um grupo de patologias de origem multifatorial, abrangendo fatores genéticos, doenças precursoras, fatores ambientais, dentre outros. Atualmente, câncer como os de mama e do colo do útero se destacam em relação a incidência. Ainda que diversas campanhas de conscientização e prevenção estejam ocorrendo país a fora, o número de pessoas acometidas continua elevado. Embora no Brasil o cuidado com a saúde seja muito mais efetivo entre as mulheres comparativamente aos homens, o diagnóstico tardio, seja pela falta do atendimento em serviços de saúde ou por descuido, faz com que as taxas de mortalidade mantenham-se em alta ,o que torna necessário novos investimentos em infraestrutura, métodos diagnósticos e desenvolvimento de novas formas de tratamento (FARDIN *et al.* 2004).

Diante da alta incidência e da gravidade dos mais variados tipos de cânceres que afetam a saúde humana, fato este que tem acarretado gastos cada vez maiores, tanto por parte de governos, quanto de instituições privadas, os investimentos focados na descoberta da cura, ou pelo menos de um tipo de tratamento que seja menos agressivo e mais eficaz contra o câncer, torna-se imprescindível que novos estudos sejam elaborados e propagados. Além disso, a divulgação e análise destas pesquisas, levam junto à discussão, ampliar o interesse de pesquisadores nestas promissoras linhas de trabalho, alçando a novos patamares o tratamento e a possível descoberta da cura de doenças tão temidas e agressivas como as que compõe este grupo ora analisado.

5. DESENVOLVIMENTO

5.1 Inibidores de proteinases

Inibidores de proteinases foram detectados, isolados e purificados à partir de diversos tecidos e órgãos vegetais, tais como na polpa dos frutos, caules, raízes e folhas e nas mais ricas fontes destes, tubérculos e sementes (ARAÚJO et al, 2004 ; GOMES et al, 2005 ; OLIVEIRA et al, 2003 ; MITRA, 2001).

A presença de inibidores em alto teor nas sementes de um grande número de espécies vegetais vem despertando o interesse em suas funções fisiológicas, dos quais se destacam uma provável proteção contra fungos, insetos e parasitas (CARLINI, 2002; LOPES, 2006).

Os inibidores são classificados em quatro classes: inibidores de proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas e de metalo-proteinases, sendo de grande variedade de família os inibidores serínicos, no entanto os mais estudados são inibidores de proteinases do tipo Kunitz e Bowman-Birk (GOMES et al., 2005b ; MITRA, 2001).

Inibidores do tipo Kunitz são proteínas com massa molecular de 18 a 26 kDa, constituídos por uma ou duas cadeias polipeptídicas, contendo geralmente apenas um sítio reativo e a maioria deles possuem quatro resíduos de Cys conservados que formam duas ligações de dissulfeto em polipeptídeos únicos ou de cadeia dupla (JAMAL et al., 2013).

Inibidores do tipo Kunitz possuem maior atividade inibitória contra proteinases serínicas, principalmente tripsina e quimiotripsina (OLIVEIRA, 2001).

Observamos então a existência de um grande número de inibidores, como já destacado, todavia nos chama atenção inibidores de tripsina do tipo EcTI (*Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor), ou seja, inibidores de tripsina extraídos de plantas da família Fabaceae, subfamília Mimosoideae denominadas *Enterolobium contortisiliquum*. Estes vegetais são árvores de grande porte, podendo atingir cerca de 20 a 35 metros de altura cuja a distribuição no Brasil ocorre desde o Pará até o Rio Grande do Sul (LORENZI 2000, TOKARNIA et al. 2012). Recebem diversas nomenclaturas populares como orelha de macaco, tamboril, timbó e pacará (MIRANDA et al., 2015).

5.2 Extração do inibidor

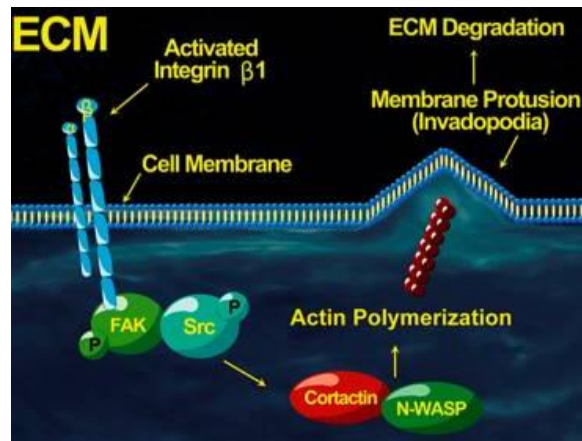
Em síntese, com base no método proposto por Batista et al (1996) as sementes de *E. contortisiliquum* são inchadas com NaCl e homogeneizadas em um misturador. O extrato bruto é então centrifugado e o sobrenadante coletado, sendo as proteínas precipitadas com acetona. O sedimento é então seco a vácuo e solubilizado em tampão. Passa pelo processo de lavagem com tampão de equilíbrio e o inibidor é eluído com NaCl. Realiza-se a medição do tampão e da atividade inibidora através da inibição da hidrólise de tripsina de 1 m M DE α -benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida como substrato. As partes contendo atividade inibidora são então separadas e aplicadas sequencialmente em diversas etapas chegando a última etapa da purificação realizada por cromatografia de fase reversa em uma coluna de proteína / peptídeo C₁₈ desenvolvida com um gradiente de acetonitrila (0–100%) em ácido trifluoroacético (TFA) (0,1%, v / v) à temperatura ambiente, onde o pico isolado foi denominado EcTI.

A homogeneidade e o peso molecular do inibidor são então avaliados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 8-12%. A pureza da preparação foi avaliada por cromatografia em fase reversa. Esta por sua vez produz um pico principal, que é coletado e aplicado a SDS-PAGE. O SDS-PAGE revela a presença de uma banda, indicando a ocorrência de apenas uma população de proteínas no pico coletado. A banda revelada pelo SDS-PAGE terá cerca de 20 kDa, representando assim o EcTI purificado. A atividade conservada do inibidor purificado é confirmada por sua capacidade de bloquear a atividade da tripsina em testes *in vitro*.

5.3 Mecanismo de Ação

Para compreendermos o mecanismo de ação das EcTI, segundo Albrechtsen (2010) devemos inicialmente compreender o funcionamento intrínseco de toda uma rede de estruturas das quais destacaremos as denominadas genericamente de “invasópodes”. Estas estruturas possuem papel na degradação da matriz extracelular (MEC) durante a invasão celular (Figura 1).

Figura 1- Integrinas mediando ligações celulares às proteínas da MEC com ativação da quinase Scr e da FAK. Por conseguinte, através de precursores como a cortactina e a N-WASP ocorre a polimerização das actinas que facilitam a adesão.



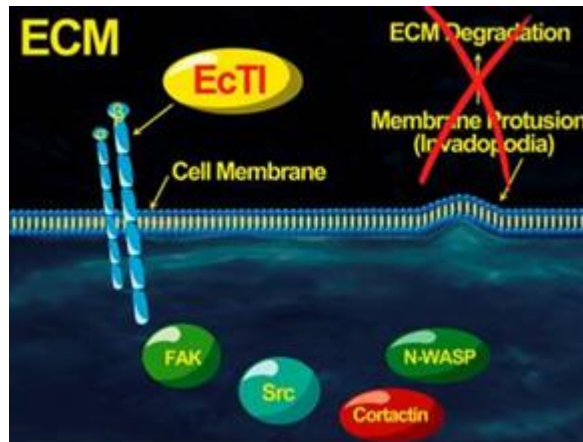
Fonte: Paula (2012)

O processo de metástase envolve a invasão das células tumorais no tecido periférico, consequentemente das células cancerígenas no sangue ou vasos linfáticos e eventual fixação em um local secundário. Com a evolução do câncer, estas células irão interagir com os componentes da MEC modificando os arranjos celulares de adesão. Os invasópodes são ricos em actinas adesivas localizadas na superfície de células tumorais invasivas (ALBRECHTSEN, 2010). Estas estruturas são montadas a partir de precursores como a actina, a cortactina e a proteína N-WASP -proteína da síndrome neural de Wiskott-Aldrich (SMITH-PEARSON PS, *et al.* 2010).

É relevante discutirmos a ampla funcionalidade das integrinas que mediam ligação celular às proteínas da MEC, além da adesão celular, proliferação e motilidade pelas cascatas de sinalização. Atuam ainda mediando interações protéicas importantes para a migração celular (BOZATO, 2015).

O agrupamento de integrinas ativa as quinases Src e de adesão focal quinase (FAK) que irão facilitar a propagação de vias de transdução de sinal a partir de locais de adesão. Estas controlam ainda vias que incluem a motilidade e a sobrevivência da célula (SCHNEIDER, 2011). A FAK atua no centro da regulação da adesão , estando localizada nas aderências da MEC, desta forma , age mediando a sobrevivência, diferenciação, proliferação, metástase e remodelação tecidual das células. Recruta ainda Src para os locais de adesão , onde esta última potencializará a ativação da FAK pela fosforilação de resíduos de tirosina criando locais de interação para proteínas envolvidas no remodelamento do citoesqueleto (BONET & HERNANDEZ, 2014).

Figura 2 - Mecanismo de ação do Inibidor da tripsina de *E. contortisiliquum*(EcTI)



Fonte: Paula ,2012.

Utilizando-se EcTI, ocorre o bloqueio das integrinas que conseqüentemente não conseguem ativar as quinases Src e as FAK, bloqueando a propagação dos sinais de transdução e o processo metastático.

Experimentos realizados por Bezerra (2014) mostraram que diante da tripsina, EcTI (C) apresentou mecanismo de inibição do tipo não competitivo, onde é observado que o percentual de inibição atingido pelo inibidor em cada concentração se mantém contante, mesmo com o aumento da concentração de substrato. No entanto em estudos realizados por Zhou *et al.* (2013), analisando a estrutura de EcTI, em seu aspecto tridimensional, classificaram-a como inibidor do tipo substrato, onde há interação direta com o sítio ativo da tripsina, em um mecanismo “chave-fechadura” através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, características de inibidores competitivos.

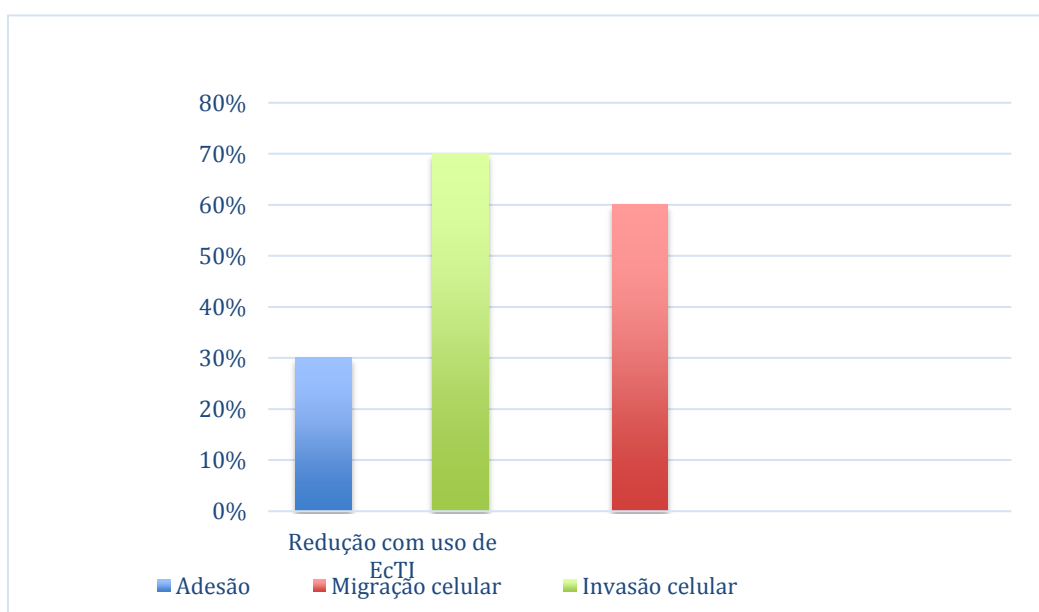
5.4 Atividade do inibidor sobre diferentes linhagens de células

Em um estudo de Paula *et al.* (2012) onde foram investigadas a atividade de EcTI, um inibidor do tipo Kunitz purificado a partir de sementes de *E. contortisiliquum*, na viabilidade celular em linhagens de células de câncer gástrico e também em linhagens celulares não-cancerígenas (onde foram utilizados fibroblastos), cujo objetivo fora de avaliar a especificidade do inibidor EcTI em relação às células cancerígenas houve diminuição na viabilidade das células cancerígenas quando do uso do inibidor em todas as diferentes concentrações testadas, enquanto a viabilidade das células não-cancerígenas só foi diminuída quando utilizadas as concentrações mais altas testadas. A viabilidade das células

cancerígenas diminuiu de maneira dependente do tempo e da dose. Ainda segundo os autores, EcTI não produziu qualquer efeito sobre a proliferação de células cancerígenas gástricas, porém quando tratadas com EcTI apresentaram morfologia alterada e houve comprometimento da adesão com a placas de cultura. Chamou atenção dos pesquisadores o fato do alto efeito limitante das EcTI na adesão e invasão das células do câncer gástrico enquanto nos fibroblastos não se observou o mesmo.

De acordo com Lobo (2017), EcTI afetou a viabilidade e a proliferação, mas não demonstrou efeito significativo sobre a morte celular em células cancerígenas da mama (FIGURA 3). Ambos estudos concluíram que o inibidor bloqueou a adesão das diferentes linhagens de células cancerígenas ao colágeno I.

Figura 03 – Ação inibitória de EcTI sobre as células de câncer de mama.

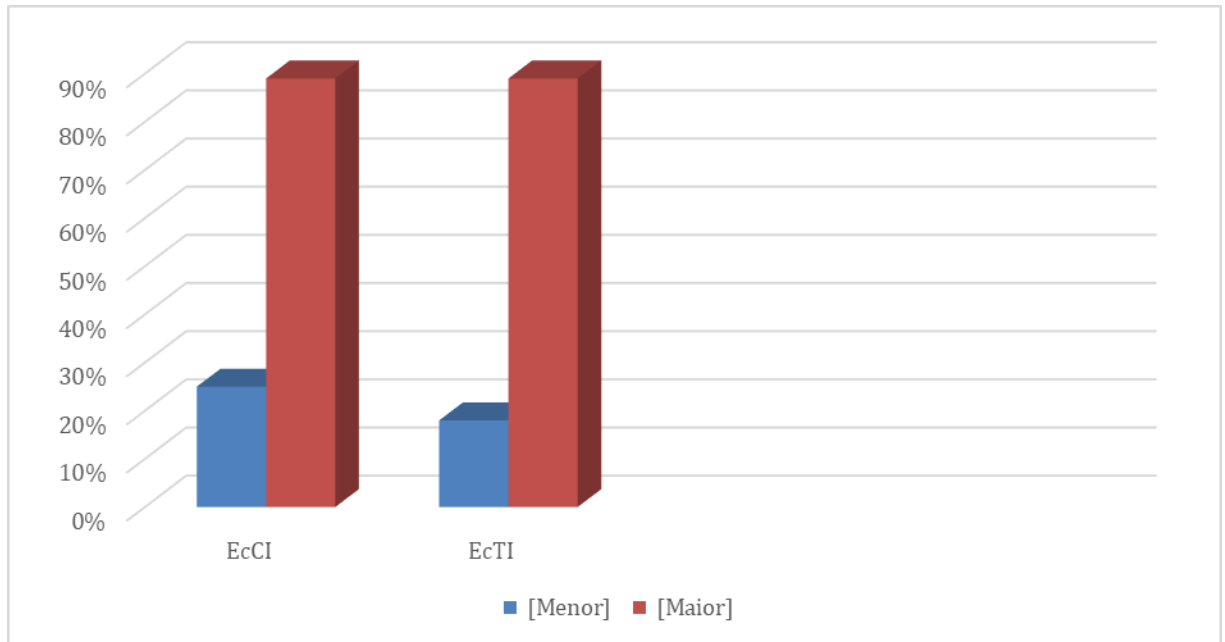


Fonte: Elaborado pelos autores com base em Lobo (2017)

Em estudo *in vitro* sobre a atividade antiproliferativa de inibidores de tripsina sobre células de adenocarcinoma colorretal humano da linhagem HT29 foi observado que mesmo nas menores concentrações de EcTI utilizadas, houve cerca de 20% de inibição quando comparado ao controle sem o inibidor, podendo chegar a 89% de inibição à proliferação das células analisadas, dependendo das condições do experimento e das concentrações do inibidor utilizadas em cada amostra (BEZERRA,2014). Neste trabalho , além de EcTI que inibe tripsina e também quimiotripsina , foi analisado o inibidor exclusivo e muito mais eficaz de quimiotripsina, EcCI, os dados comparativos são apresentados abaixo (FIGURA 4).

Os resultados observados são corroborados pelos estudos de Nakata et al (2011) onde células HT29 tratadas com EcTI foram inibidas em sua proliferação em torno de 80%.

Figura 04- Inibição promovida pelos inibidores de quimiotripsina e tripsina EcCI e EcTI em células HT29.



Fonte : Elaborado pelos autores baseado em Bezerra,2014.

Este estudo mostra-se relevante ao reiterar a ação de EcTI e acrescentar mais um inibidor de quimiotripsina do tipo Kunitz à lista dos inibidores de proteases com potencial para futuros tratamentos do câncer de colorretal.

6 CONCLUSÃO

Dado o exposto, observa-se que os inibidores de proteases do tipo EcTI bloqueiam integrinas impedindo ativação das quinases Src e as FAK, levando a restrição da propagação de sinais da transdução e ocorrência de metástase, atuando de forma inibitória não competitiva, sendo considerado um inibidor do tipo substrato por interagir diretamente com o sítio ativo da tripsina. EcTI apresentaram eficácia tornando inviáveis células de câncer gástrico mesmo quando utilizadas em diferentes concentrações, sendo esta viabilidade diminuída de maneira tempo e dose dependente. Apesar de não ter produzido efeitos sobre a proliferação desta linhagem celular cancerígena, o inibidor de tripsina EcTI, modificou a morfologia destas células, comprometendo sua adesão e invasão. Células cancerígenas da mama quando tratadas com EcTI tiveram sua viabilidade e proliferação afetadas, todavia não houveram efeitos relevantes quanto à morte celular, enquanto em células de adenocarcinoma colorretal humano da linhagem HT29 ocorreu ação inibitória em sua proliferação variando de 20% a 89% dependendo das condições e das concentrações do inibidor. O uso de EcTI mostrou-se promissor em relação aos diferentes tipos de câncer analisados deixando como perspectiva futura novos estudos de mecanismos inibitórios sobre linhagens celulares além das já analisadas, e da ampliação dos estudos *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBRECHTSEN, Reidar et al. **O envolvimento extracelular de ADAM12 induz aglomerados de invadopódios com atividade de liberação de ectodomínio localizada.** Pesquisa experimental de células , v. 317, n. 2, pág. 195-209, 2011.
2. BATISTA IF, Oliva ML, Araujo MS, Sampaio MU, Richardson M, Fritz H, Sampaio CA. **Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from Enterolobium contortisiliquum seeds.** Phytochemistry. 1996 Mar;41(4):1017-22. doi: 10.1016/0031-9422(95)00710-5. PMID: 8728712.
3. BATISTA, IFC;Nonato,MC; Bonfadini MR, Beltramini LM, Oliva MLV,Sampaio MU, Sampaio CAM and Garratt RC . **Preliminary crystallographic studies of EcTI, a serine proteinase inhibitor from Enterolobium contortisiliquum seeds-** Acta Crystallographica Section D 2001;57(4):602-604
4. BATISTA, I. F. C. et al. **Preliminary crystallographic studies of EcTI, a serine proteinase inhibitor from Enterolobium contortisiliquum seeds.** Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, v. 57, n. 4, p. 602-604, 2001.
5. BEZERRA, Ágnes Denise de Lima et al. **Atividade antitriptica de proteínas em polpas e sementes de frutas tropicais.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 36, n. 2, p. 408-416, 2014.
6. BONAZZA, Camila. **Estudo do efeito do ecti (enterolobium contortisiliquum trypsin inhibitor), inibidor de metalo-proteases com ação no complexo de adesão focal, em células extraídas de pacientes com leiomioma uterino-análise comparativa com 17b-estradiol e progesterona.** 2016.
7. BONTURI, Camila Ramalho. **Ação dos inibidores de proteases, ecti e cratabl, em linhagens de câncer cerebral (glioblastoma multiforme).** 2015.
8. BOZATO, Reni Luci. **Efeito do inibidor de protease ecti em células tumorais de câncer de próstata.** 2015.
9. CARVALHO, Raquel et al. 2.10. 06–Farmacologia/Etnofarmacologia . **Efeito do inibidor de tripsina purificado de Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) sobre a desgranulação de mastócitos e viabilidade, produção de H2O2 e adesão por macrófagos peritoneais.** In: Reunião anual da sociedade brasileira para o progresso da ciência, 65, 2013, Recife. Ciência para um novo Brasil. Recife: UFPE: SBPC, 2013. 2 p.
10. COLARES, Lara Franca. **Deteccão de inibidores de proteases em cinco espécies vegetais nos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.** 2016.
11. DE OLIVEIRA, CFR et al. **Purification and biochemical propertiers of a kunitz-type trypsin inhibitor from Entada acaciifolia (Benth.)seeds.** Process Biochemistry, v 47 n 6, p. 929-935, 2012.
12. DE PAULA, Cláudia Alessandra Andrade et al. **O inibidor de tripsina Enterolobium contortisiliquum (EcTI), um inibidor de proteinase vegetal, diminui a adesão e invasão celular in vitro pela inibição das vias de sinalização da proteína-quinase de adesão focal Src**

(FAK). *Journal of Biological Chemistry* , v. 287, n. 1, pág. 170-182, 2012.

13. GOMES, A.E.A.D. Barbosa, L.L.P. Macedo, J.C.M. Pitanga, F.T. Moura, A.S. Oliveira, R.M. Moura, A.F.S. Queiroz, F.P. Macedo, L.B.S. Andrade, M.S. Vidal, M.P. Sales, Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly), *Plant Physiology and Biochemistry* 43 (2005) 1095 e 1102.

14. LOBO, Yara Aparecida. Ação Do Inibidor De Tripsina Isolado De Sementes De *Enterolobium Contortisiliquum* Sobre A Linhagem De Células De Câncer De Mama Mda-Mb-231. 2017. Disponível em <http://www.repositorio.unifesp.br/handle/11600/50553>. Acesso em 10 Out. 2019.

15. LOBO, Yara Aparecida. Ação do inibidor de proteinase de *enterolobium contortisiliquum*, ecti, em células de endométrio de pacientes com endometriose. 2013.

16. LOBO, Yara A. et al. EcTI prejudica as vias de sobrevivência e proliferação no câncer de mama triplo-negativo, modulando os glicosaminoglicanos celulares e as citocinas inflamatórias. *Cancer Letters* , v. 491, p. 108-120, 2020.

17. LOPES, José Luiz de Souza. Purificação e investigação de propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos das sementes de aácia plumosa Lowe. 2006. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006. doi:10.11606/D.76.2006.tde-18092007-112855. Acesso em: 2020-11-17.

18. LORENZI, H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3 ed. v. 1. Instituto Plantarum, São Paulo

19. LUCENA, Sheila Varela. Purificação, caracterização e avaliação da atividade antiproliferativa de um inibidor de quimotripsina tipo kunitz de semente de *Eryhrina velutina*. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

20. MEDEIROS, Amanda Fernandes de. Caracterização bioquímica do inibidor de tripsina purificado da semente de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) e avaliação do seu efeito na secreção de colecistocinina e leptina em modelo de obesidade experimental. 2017. Dissertação de Mestrado. Brasil.

21. MENDES, Ernani Costa; VASCONCELLOS, Luiz Carlos Fadel de. Cuidados paliativos no câncer e os princípios doutrinários do SUS. *Saúde em Debate*, v. 39, p. 881-892, 2015.

22. MONTEIRO, Márcia Regina Pereira et al. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 2, p. 195-205, 2004.

23. NAKAHATA AM, Mayer B, Ries C, de Paula CA, Karow M, Neth P, Sampaio MU, Jochum M, Oliva ML. The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. *Biol Chem*. 2011 Apr;392(4):327-36. doi: 10.1515/BC.2011.031. PMID: 21781023.

24. OLIVEIRA ,AS; Pereira RA; . Lima, LM; A.H.A. Morais, F.R. Melo, O.L. Franco, C.

- Bloch, M.F. Grossi-de-Sa, M.P. Sales, Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora* DC), *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72 (2002) 122e132.
25. OLIVEIRA AS , L. Migliolo, R.O. Aquino, J.K.C. Ribeiro, L.L.P. Macedo, L.B.S. Andrade, M.P. Bemquerer, E.A. Santos, S. Kiyota, M.P. Sales, Purification and amino acid sequences analysis of one Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards insect pests,
26. PAIVA, PMG et al. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. *Phytochemistry*, v. 67, p. 545-552. 2006.
27. PAIVA, Carlos Eduardo et al. Tumor de células germinativas de testículo simulando câncer de pâncreas. *Rev Bras Cancerol*, v. 52, n. 3, p. 253-6, 2006.
28. PAULA, Claudia Alessandrade Andrade de. EcTI, um inibidor de protease de planta, diminui a adesão e a invasão celular in vitro através da inibição da via de sinalização Src-FAK. 2013.
29. SCHNEIDER, J. G., Amend, S. R., and Weilbaecher, K. N. Integrinas e metástases ósseas: integração de células tumorais e interações de células estromais (2011) *Bone* 48, 54–65
30. SMITH-PEARSON P. S. ,Greuber E. K. ,Yogalingam G. ,Pendergast A. M.(2010) *J. Biol. Chem.* 285 , 40201 – 40211.
31. SUN, Ming et al. LncRNA HOXA11-AS promove a proliferação e invasão do câncer gástrico por andaime os fatores de modificação da cromatina PRC2, LSD1 e DNMT1. *Pesquisa sobre câncer* , v. 76, n. 21, pág. 6299-6310, 2016.
32. SUN,J; WANG,H. NG, TB. Trypsin isoinhibitors with antiproliferative activity toward leukemia cells from *Phaseolus vulgaris* cv “whith cloud bean”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. V. 2010, p. 1-8, 2010.
33. TABOSA, Pedro Matheus Sousa. Inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum* interfere no desenvolvimento das larvas de *Aedes aegypti* e potencializa a ação das proteínas cry oriundas do *Bacillus thuringiensis*. 2019.
34. THEODORO JUNIOR, Osmar Aparecido. Efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal EcTI, sobre a lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57Bl6. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/314778>.
35. TOKARNIA, C.H. et al. Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção. 2.ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2012. 566p.
36. ZHOU, Dongwen et al. Estruturas cristalinas de um inibidor de tripsina vegetal de *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) e de seu complexo com tripsina bovina. *PLoS One* , v. 8, n. 4, pág. e62252, 2013.