

# ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS EN EL PRIMER INHIBIDOR DE TRIPSINA AISLADO DE SEMILLAS DE CHAÑAR

## STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES IN THE FIRST TRIPSIN INHIBITOR ISOLATED FROM CHAÑAR SEEDS

Brenda Ozón<sup>1</sup>; Florencia Geier<sup>1</sup>; Martina Rossotti<sup>1</sup>; Candela Saman<sup>1</sup>; Santiago Claver<sup>1</sup>; Ana Laura Vicario<sup>2</sup>; Evelina Quiroga<sup>2</sup>; Walter David Obregón<sup>1</sup>; Juliana Cotabarrén<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Proteasas Vegetales (CIPROVE), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

<sup>2</sup> Laboratorio de Membranas y Biomateriales, Instituto de Física Aplicada (INFAP), Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis-CONICET, San Luis, Argentina.

E-mail: [brendaozon@gmail.com](mailto:brendaozon@gmail.com)

Recibido: 30 enero2021, aceptado 15 marzo 2021.

Artículo científico

### RESUMEN

Los inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) son compuestos químicos de bajo peso molecular encontrados en tejidos y fluidos de animales, plantas y microorganismos. La potencialidad y eficacia terapéutica de los IPPs han sido reportados para diferentes enfermedades. A pesar de esto, su uso como inhibidores de enzimas involucradas en desórdenes metabólicos ha sido poco estudiado, por lo que la búsqueda de nuevos agentes alternativos de origen natural que puedan ser aplicados en tales patologías se vuelve relevante. En este estudio se presenta el aislamiento y purificación del primer inhibidor de tripsina termoestable de *Geoffroea decorticans* (GdTI), una proteína de 6743.7 Da con fuerte actividad inhibitoria ( $K_i=2,1$  nM) aún luego de ser sometido a elevadas temperaturas y pHs extremos (100% de actividad luego de 5 h a 100 °C y 80% de actividad luego de 1 h a pH 2-12),

representando uno de los inhibidores de serín proteasas más potentes de origen vegetal. Además, fue posible evidenciar que GdTI presenta actividad anticoagulante para las vías de coagulación intrínseca y extrínseca, siendo el primer inhibidor de origen vegetal con efecto sobre la vía extrínseca de coagulación. Finalmente, GdTI mostró actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50}= 0.18$   $\mu$ M) evidenciando su potencial como agente hipoglucémico. Los resultados de este trabajo sugieren que GdTI puede ser empleado como una droga antidiabética natural, debido a su actividad antitrombótica e hipoglucémica, alentando futuros estudios con impacto en su potencial aplicación biomédica.

**Palabras clave:** *Geoffroea decorticans*, inhibidor de tripsina, hipogluceante, anticoagulante.

### ABSTRACT

Protease peptide inhibitors (PPIs) are low molecular weight chemical compounds found in tissues and fluids of animals, plants and microorganisms. The potential and therapeutic efficacy of PPIs have been reported for different diseases. Despite this, its use as inhibitors of enzymes involved in metabolic disorders has been little studied, so the search for new alternative agents of natural origin that can be

applied in such pathologies becomes relevant. This study presents the isolation and purification of the first *Geoffroea decorticans* thermostable trypsin inhibitor (GdTI), a protein of 6743.7 Da with strong inhibitory activity ( $K_i = 2.1$  nM) even after being subjected to high extreme temperatures and pHs (100% activity after 5 h to 100°C and 80% activity after 1 h to pH 2-12), representing one of the most potent serine

protease inhibitors of plant origin. In addition, it was possible to show that GdTI has anticoagulant activity for the intrinsic and extrinsic coagulation pathways, being the first inhibitor of plant origin with effect on the extrinsic coagulation pathway. Finally, GdTI showed inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase ( $CI_{50} = 0.18 \mu M$ ) showing its potential as a hypoglycemic agent. The results of this work suggest that GdTI may be used

as a natural antidiabetic drug, due to its antithrombotic and hypoglycemic activity, encouraging future studies with an impact on its potential biomedical application.

**Key Words:** *Geoffroea decorticans*, trypsin inhibitor, hipoglycemic, anticoagulant.

## INTRODUCCIÓN

Los inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) son compuestos químicos de bajo peso molecular encontrados en tejidos y fluidos de animales, plantas y microorganismos. Son moléculas reguladoras que controlan la actividad de sus proteasas blanco, en algunos casos bloqueando su actividad exacerbada y descontrolada, con el objeto de prevenir la proteólisis indeseada. Se cree que la función principal de los IPPs de plantas está asociada a los mecanismos de defensa y regulación de proteasas endógenas, pero también pueden funcionar como proteínas de almacenamiento (Mosolov et al., 2001). La actividad inhibitoria de los IPPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima mediante interacciones por puentes disulfuro, de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. En los últimos años se han informado novedosas actividades biológicas en IPPs de origen vegetal que no están directamente relacionadas con su inhibición de la actividad proteolítica. El uso tradicional de los IPPs en biomedicina está referido a su acción sobre proteasas blanco que se encuentran sobreexpresadas en determinadas patologías. Su potencialidad y eficacia terapéutica ha sido reportada para diferentes enfermedades: autoinmune, inflamatorias y respiratorias (Ottaviani et al., 2006), cardiovasculares y neurodegenerativas (tal como Alzheimer) (Wood et al., 2003) y han resultado ser útiles para el diseño de fármacos para prevenir la propagación de organismos que provocan enfermedades peligrosas, como el SIDA (Arribas et

al., 2005), el cáncer (Clemente & Del Carmen Arques, 2014; Kennedy & Wan, 2002) y la malaria (Dash et al., 2003). Por este motivo, el control de la proteólisis ha surgido como una herramienta farmacológicamente eficiente, utilizando diferentes inhibidores de proteasa para tratar enfermedades infecciosas y sistémicas. A pesar de todas las actividades biológicas (y sus posibles aplicaciones) mencionadas anteriormente, su uso como inhibidores de enzimas involucradas en desórdenes metabólicos ha sido poco estudiado. La búsqueda de nuevos agentes anticoagulantes e hipoglucemiantes de origen natural es de gran interés y relevancia dado su potencial uso e implicancia en terapias biomédicas relacionadas con estas enfermedades metabólicas.

En particular, las fuentes vegetales de IPPs son un campo escasamente explorado, aunque muestran gran riqueza y diversidad. Tal es el caso de *Geoffroea decorticans*, un árbol presente en regiones áridas de Sudamérica cuyo nombre popular es chañar. Si bien esta especie vegetal ha sido investigada previamente en su composición química y propiedades nutricionales —como fuente de nutrientes esenciales— los estudios de proteínas purificadas en esta especie son escasos. Es por ello que en este trabajo se plantea el aislamiento, purificación y caracterización de un nuevo IPP vegetal utilizando como material de partida una planta inédita que crece en nuestro país, chañar (*Geoffroea decorticans*), que ha sido utilizada como planta medicinal y alimentaria por las diferentes culturas de nuestra región.

## OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es el aislamiento y purificación de inhibidores peptídicos de proteasas a partir de semillas de Chañar (*Geoffroea decorticans*). Se plantea el aislamiento y purificación de sus inhibidores peptídicos de

proteasas, su caracterización bioquímica y proteómica, y la evaluación de sus potenciales actividades biológicas como agentes anticoagulantes y antidiabéticos naturales mediante ensayos *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se preparó un extracto crudo procesando 10 g de semillas de chañar con 100 ml de buffer Tris-HCl 0.1 M (pH 7.5) y se incubó durante 120 min a 4 °C en agitación. La suspensión fue filtrada, centrifugada y luego se recolectó el sobrenadante (al que llamamos GdEC). Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford (1976) usando BSA (10-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) como estándar para la curva de calibración y se evaluó la actividad inhibitoria de tripsina mediante el incremento de la absorbancia a 410 nm producto de la hidrólisis del sustrato BAPNA. Se realizó una curva dosis-respuesta a partir de la cual se determinó la concentración a la cual se produce una inhibición del 50% en la actividad enzimática ( $IC_{50}$ ) y la constante cinética de inhibición ( $K_i$ ) se calculó a partir del gráfico de Dixon ( $1/v$  vs  $[I]$ , donde  $[I]$  es la concentración de inhibidor) (Cisneros et al., 2020).

Se realizó un paso inicial de purificación parcial del inhibidor de tripsina por tratamiento térmico. GdEC fue sometido a temperaturas entre 40 y 100 °C en baño de agua por 30 min, luego se centrifugó y se colectó el sobrenadante (al que denominamos GdTT40-GdTT100). A cada tratamiento se le determinó el contenido proteico y la actividad inhibitoria de tripsina. Luego una alícuota de 2 ml de GdTT90 (80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) se sembró en una columna de exclusión molecular con un relleno de Sephacryl S-100 HR. La elución se realizó con buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7.5) a una velocidad de flujo de 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ , monitoreando la absorbancia a 280 nm. Las fracciones que presentaron actividad inhibitoria de tripsina se sembraron en una columna con tripsina

inmovilizada. Las proteínas no retenidas fueron eluidas con buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5 a una velocidad de 0.7  $\text{mL min}^{-1}$  y la fracción retenida fue eluida con buffer glicina-HCl pH 2.6 para lograr la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor. Las fracciones eluidas fueron neutralizadas y se les determinó actividad inhibitoria de tripsina y concentración de proteínas. El inhibidor de tripsina purificado fue nombrado GdTI.

Se evaluó el peso molecular de GdTI mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12%) y por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS. Luego se identificó mediante digestión triptica y se analizó por nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masas con tecnología Orbitrap. Se realizaron ensayos de estabilidad fisicoquímica sometiendo a GdTI a valores extremos de pH (pH 2-12) durante 1 h a 25 °C, luego la muestra se neutralizó. Para el ensayo de estabilidad térmica, alícuotas de GdTI fueron incubadas a 40-100 °C por 1 h y luego enfriadas a temperatura ambiente. También se determinó la estabilidad a una temperatura fija (90 y 100 °C) por 0.5-5 h. En todos los casos se evaluó la actividad inhibitoria de tripsina residual. Por último se evaluaron las potenciales actividades biológicas de GdTI: (a) actividad anticoagulante mediante la determinación del tiempo de protrombina y de tromboplastina parcial activado, y (b) actividad hipoglucemiante mediante la determinación de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la metodología detallada, se obtuvo un extracto crudo (GdEC) con un contenido proteico total de  $171.2 \pm 8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  y actividad inhibitoria de tripsina de  $21.35 \pm 3.25$  UIT. Basado en estudios que evidencian que los IPPs presentan gran estabilidad fisicoquímica con mínima pérdida de actividad inhibitoria (Cotabarrén et al., 2018, 2020; Martins et al., 2018; Souza et al., 2014; Torres-Castillo et al., 2009)—esencialmente atribuida a sus numerosos puentes disulfuro (Qi et al., 2005)—, se propuso el tratamiento de GdEC a altas temperaturas por 30 min como paso inicial de purificación. Mediante esta estrategia se redujo el contenido proteico total en las

fracciones tratadas térmicamente sin pérdida significativa de la actividad inhibitoria de tripsina. Así, se evidenció una  $IC_{50}$  de  $0.66 \pm 0.17 \mu\text{g mL}^{-1}$  para GdTT90 y una  $IC_{50}$  de  $0.55 \pm 0.18 \mu\text{g mL}^{-1}$  para GdTT100. Se evaluó la distribución proteica en los diferentes tratamientos térmicos mediante SDS-PAGE, evidenciando una progresiva disminución en las bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular, mayores a 30 kDa como función del aumento de temperatura lo cual puede indicar la eliminación de proteínas termolábiles. Además, 4 fracciones proteicas de aproximadamente 30 kDa, 20 kDa, 15 kDa y menos de 10 kDa no son afectadas

por el aumento de temperatura, lo que confirma la presencia de proteínas o péptidos termoestables. Considerando que GdTT90 constituye un método simple y efectivo para la remoción de proteínas termolábiles, fue seleccionado como muestra para ser sembrada en la columna de exclusión molecular. Se midió la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas y se determinó la actividad inhibitoria de tripsina en cada una. Las fracciones que presentaron actividad inhibitoria de tripsina fueron sembradas en una columna con tripsina inmovilizada en glioxil-agarosa, donde luego de la elución de las proteínas no retenidas, se aplicó un gradiente de pH ácido que eluyó el inhibidor de tripsina, llamado GdTI.

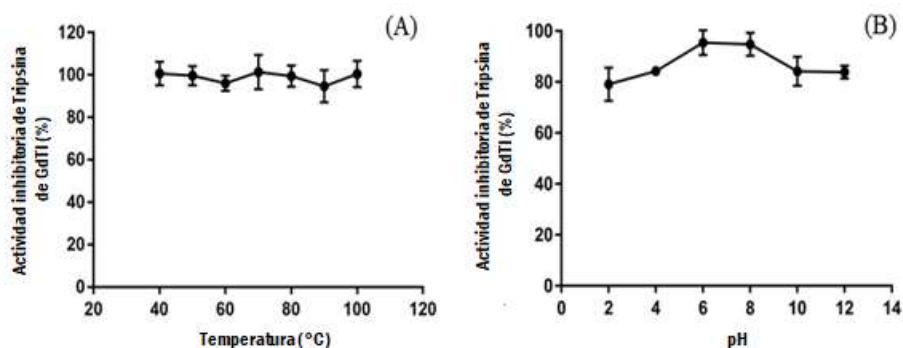
Los pasos de purificación elegidos permitieron un grado de purificación de 12.8 veces y un rendimiento de 39.9% respecto al extracto crudo inicial. Los estudios cinéticos de inhibición de tripsina para GdTI mostraron que la  $IC_{50}$  fue de 0.22  $\mu$ M, mientras que la  $K_i$  fue de 2.1 nM, indicando que la actividad inhibitoria de tripsina ocurre a muy bajas concentraciones de inhibidor, lo cual indica un fuerte vínculo entre el inhibidor y la proteasa blanco, permitiendo afirmar que GdTI es un inhibidor muy potente.

Para determinar la masa molecular, GdTI se analizó por espectrometría de masas, resultando en una señal de 6743.7 Da. Sin embargo, la masa estimada por SDS-PAGE fue aproximadamente 20 kDa, triplicando el valor obtenido por MALDI-TOF/MS. Estos resultados coinciden con reportes en los que se observó que muchos inhibidores de tripsina tienden a auto-asociarse, formando dímeros, trímeros y oligómeros cuando están en solución. Aunque las condiciones reductoras del SDS-PAGE permitirían visualizar monómeros, otros autores

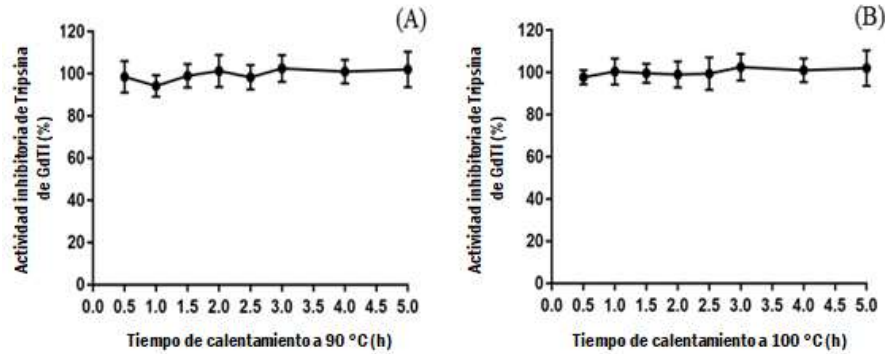
informaron la presencia de bandas que corresponden a diferentes formas tridimensionales de IPPs, por lo que la reducción y alquilación de los puentes disulfuro no es completa en estas condiciones. Por ésto, se puede afirmar que el inhibidor de tripsina de chañar tiene una masa molecular de 6743.7 Da y tiende a formar trímeros en solución, incluso en condiciones reductoras como las usadas en el SDS-PAGE.

GdTI también fue sometido a digestión triptica y análisis por nano HPLC acoplado a un espectrómetro de masas con tecnología Orbitrap, lo que permitió separar e identificar los péptidos obtenidos. Se identificó un péptido con secuencia SNPPQCR que coincide con los residuos 63-69 del inhibidor de tripsina de Bowman-Birk de soja (*Glycine max*, N° de acceso RZB69152). Analizando esta secuencia se observó que dicha región pertenece al dominio conservado de los inhibidores de tripsina tipo Bowman-Birk (BBI), lo que nos permite afirmar que GdTI pertenece a dicha familia.

GdTI fue sometido a diferentes temperaturas y pHs para demostrar su estabilidad. Pudimos observar que es estable en todas las condiciones utilizadas, manteniendo  $100 \pm 4\%$  y  $79 \pm 5\%$  de su actividad inhibitoria promedio a temperaturas y pHs extremos, respectivamente (Figura 1). Realizando incubaciones a 90 y 100°C por tiempo prolongado, la actividad inhibitoria de tripsina no se modifica, mostrando  $99 \pm 5\%$  de su actividad promedio (Figura 2). Considerando que la actividad de una proteína depende del mantenimiento de su conformación nativa, es evidente que GdTI es una proteína inusualmente estable, preservando su conformación nativa con alta bioactividad.



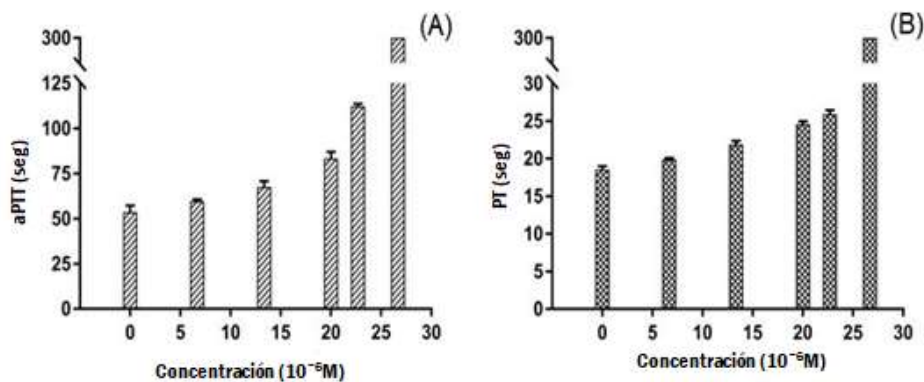
**Figura 1:** Estabilidad temperatura y pH de GdTI. (A) Actividad inhibitoria de tripsina residual luego de la incubación de GdTI por 60 min a temperaturas de 40-100 °C. (B) Actividad inhibitoria de tripsina residual luego de la incubación de GdTI por 60 min a pH 2-12.



**Figura 2:** Estabilidad a la temperatura a tiempos prolongados de GdTI. (A) Actividad inhibitoria de tripsina residual luego de incubación a 90 °C por 0.5-5 h. (B) Actividad inhibitoria de tripsina residual luego de incubación a 100°C por 0.5-5 h.

En los ensayos de actividad anticoagulante para GdTI se pudo observar que para la misma concentración de inhibidor se produce un descenso más pronunciado en el tiempo de coagulación para aPTT comparado con el tiempo requerido para PT

(Figura 3). Esto nos permite afirmar que GdTI retrasa fuertemente el tiempo de coagulación de la vía de coagulación intrínseca, mientras que para la vía extrínseca se requieren mayores concentraciones para producir el mismo efecto



**Figura 3:** Actividad anticoagulante de GdTI. (A) Tiempos de coagulación con diferentes concentraciones de GdTI para Tromboplastina Parcial activada. (B) Tiempos de coagulación con diferentes concentraciones de GdTI para Protrombina.

Finalmente, se evaluó la actividad hipoglucemiante. Se demostró la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa por GdTI, mostrando una  $IC_{50}$  de 0.18  $\mu$ M (equivalente a 1.21  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Esta actividad

sumada a la capacidad anticoagulante demostrada previamente, convierte a GdTI en una molécula con gran potencial para el desarrollo de una droga natural antidiabética.

## CONCLUSIONES

En este estudio, se logró el aislamiento, purificación y caracterización de un nuevo inhibidor de tripsina a partir de semillas de chañar, al cual denominamos GdTI. Este inhibidor ha probado ser un fuerte inhibidor de serín proteasas cuyas características bioquímicas y fisicoquímicas sobresalen respecto a las reportadas para este tipo de moléculas, convirtiendo a GdTI en una proteína con potenciales aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. En este

sentido, GdTI se destaca por presentar una actividad inhibitoria de tripsina muy fuerte ( $K_i = 2.1$  nM), siendo uno de los inhibidores de serín proteasas más potentes reportado hasta ahora. Además, GdTI tiene una estabilidad fisicoquímica muy alta (80% de la actividad inhibitoria de tripsina residual luego de 60 min a pHs extremos, 100% de la actividad inhibitoria de tripsina residual luego de 5 h a 90/100 °C), siendo el primer inhibidor de proteasas reportado que

conserva hiper-estabilidad durante tiempos prolongados de incubación a temperaturas extremas. Otro descubrimiento interesante para su potencial uso biomédico es la evidencia de capacidad anticoagulante de este inhibidor en ambas vías de coagulación, requiriendo dosis más bajas de GdTI que de heparina para producir el mismo retardo en el tiempo de coagulación para la vía aPTT. Además, sorprendentemente, GdTI representa el primer inhibidor de proteasa vegetal natural de la vía de coagulación extrínseca reportado. Finalmente, GdTI presentó una fuerte actividad inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ( $IC_{50} = 0.18 \mu M$ ), un resultado que,

junto con la actividad anticoagulante, es muy prometedor para la potencial aplicación de este inhibidor como agente antitrombótico y antidiabético natural.

De esta manera, los resultados de este estudio muestran el descubrimiento de una molécula de origen natural con características sin precedentes; GdTI es uno de los inhibidores de serín proteasas más potentes encontrados hasta ahora, con la mayor termoestabilidad reportada en la literatura, con efectos anticoagulantes para ambas vías de coagulación y que también presenta actividad hipoglucemiante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arribas, J. R., Pulido, F., Delgado, R., Lorenzo, A., Miralles, P., Arranz, A., Gonzalez-Garcia, J. J., Cepeda, C., Hervas, R., Pano, J. R., Gaya, F., Carcas, A., Montes, M. L., Costa, J. R., & Pena, J. M. (2005). Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression: 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial (OK Study). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999), 40(3), 280–287. <https://doi.org/10.1097/01.qai.0000180077.59159.f4>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cisneros, J. S., Cotabarren, J., Parisi, M. G., Vasconcelos, M. W., & Obregón, W. D. (2020). Purification and characterization of a novel trypsin inhibitor from *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* var. *overa*: Study of the expression levels and preliminary evaluation of its antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1279–1287. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.217>
- Clemente, A., & Del Carmen Arques, M. (2014). Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World Journal of Gastroenterology*, 20(30), 10305–10315. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10305>
- Cotabarren, J., Lufrano, D., Parisi, M. G., & Obregón, W. D. (2020). Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Science*, 292(January), 110398. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110398>
- Cotabarren, J., Tellechea, M. E., Avilés, F. X., Lorenzo Rivera, J., & Obregón, W. D. (2018). Biochemical characterization of the YBPCI miniprotein, the first carboxypeptidase inhibitor isolated from Yellow Bell Pepper (*Capsicum annum* L). A novel contribution to the knowledge of miniproteins stability. *Protein Expression and Purification*, 144(December 2017), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.12.003>
- Dash, C., Kulkarni, A., Dunn, B., & Rao, M. (2003). Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2), 89–119. <https://doi.org/10.1080/713609213>
- Kennedy, A. R., & Wan, X. S. (2002). Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and

- clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells\*. *The Prostate*, 50(2), 125–133. <https://doi.org/10.1002/pros.10041>
- Martins, T. F., Vasconcelos, I. M., Silva, R. G. G., Silva, F. D. A., Souza, P. F. N., Varela, A. L. N., Albuquerque, L. M., & Oliveira, J. T. A. (2018). A Bowman-Birk Inhibitor from the Seeds of *Luetzelburgia auriculata* Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth by Promoting Severe Cell Membrane Damage [Review-article]. *Journal of Natural Products*, 81(7), 1497–1507. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00545>
- Mosolov, V. V., Grigor'eva, L. I., & Valueva, T. A. (2001). [The role of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (review)]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 37(2), 131–140.
- Ottaviani, J. I., Actis-goretta, L., Villordo, J. J., & Fraga, C. G. (2006). Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. 88, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.10.001>
- Qi, R.-F., Song, Z.-W., & Chi, C.-W. (2005). Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(5), 283–292. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00048.x>
- Souza, C., Camargo, R., Demasi, M., & Santana, J. M. (2014). Effects of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitor on Purified 20S Proteasome and MCF-7 Breast Cancer Cells. 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086600>
- Torres-Castillo, J. A., Jacobo, C. M., & Blanco-Labra, A. (2009). Characterization of a highly stable trypsin-like proteinase inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire). *Phytochemistry*, 70(11–12), 1374–1381. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.009>
- Wood, E., S Hogg, R., Yip, B., V O'Shaughnessy, M., & S.G. Montaner, J. (2003). CD4 Cell Count Response to Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor- or Protease Inhibitor-Based Highly Active Antiretroviral Therapy in an Observational Cohort Study. In *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1097/00126334-200311010-00016>