

ESTUDO DE BIFLAVONÓIDES COMO INIBIDORES DE PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Amanda de Carvalho Dosatti¹, Wagner Alves de Souza Júdice²

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: amandadosatti@hotmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com²

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Cisteíno-Proteases, Inibidores, Biflavonóides

INTRODUÇÃO

As enzimas Cisteíno-proteases desempenham importante papel no metabolismo protéico celular, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, e na degradação de proteínas de matriz extracelular (Li et al., 1993). Na *Leishmania mexicana*, foi observada uma atividade de cisteíno-protease consideravelmente maior na forma amastigota de mamíferos do que na forma promastigota que vive no inseto vetor (North et al., 1981; Coombs et al., 1982; Lockwood et al., 1987; Robertson et al., 1992). Isto sugere que esta alta atividade de cisteíno-protease é de importância crucial para a sobrevivência da forma amastigota nos macrófagos do hospedeiro mamífero. Cruzipaina, a principal cisteíno-protease do *Trypanosoma cruzi*, foi identificada como um alvo terapêutico em potencial para o tratamento da Doença de Chagas reconhecida como fator de virulência do *T. cruzi*. Sendo assim, estas enzimas podem tornar-se alvos para o desenvolvimento de drogas anti-parasitárias. Flavonóides, que compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana (Peterson et al., 1998). Em função disso, esses compostos naturais têm sido alvos no desenvolvimento de novas moléculas com potencial efeito inibitório das proteases de tripanossomatídeos.

OBJETIVOS

Nosso objetivo é a caracterização de compostos biflavonoídicos naturais e semi-sintéticos como inibidores de cisteíno-proteases de tripanossomatídeos através da determinação de IC₅₀.

METODOLOGIA

Os ensaios de inibição das enzimas cruzaina (de *T. cruzi*), rCPB2.8 e suas isoformas rCPB3 e rH84Y da *L. mexicana* foram incubadas em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,5, com 2,5mM de DTT por 5 minutos a 37°C. A hidrólise do substrato Z-FR-MCA foi acompanhada pela medição da fluorescência em λ_{ex} 360nm e λ_{em} 480nm em espectrofluorímetro Hitachi F2500. Após medição da atividade inicial procedeu-se a adição de concentrações crescentes de inibidor medindo-se a atividade residual. Com os dados adquiridos foi possível calcular o IC₅₀ que corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%.

MATERIAIS / INSTRUMENTOS

As enzimas rCPB2.8 e suas isoformas rCPB3 e rH84Y de *L. mexicana* foram clonadas em vetor de expressão pQE-30 e obtida a partir de *Escherichia coli* (Sanderson et al., 2000). A cruzaina, foi obtida a partir de *E. coli* (cepa DH5 α contendo o plasmídeo de

expressão) sendo expressa, purificada e ativada seguindo procedimentos previamente reportados (Eakin et al., 1992). As concentrações molares das proteases foram determinadas por titulação do sítio ativo com inibidor de cisteíno-protease E-64 (Barret et al., 1981). O substrato Z-FR-MCA foi obtido comercialmente e utilizado como sonda fluorogênica para acompanhamento da atividade enzimática.

ESTRUTURAS MOLECULARES DE BIFLAVONÓIDES

Compostos biflavonóides foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da Universidade Federal de Alfenas. Para os nossos ensaios iniciais foram utilizados como possíveis inibidores de cisteíno-proteases de tripanossomatídeos os compostos biflavonóides semi-sintéticos VG1, VG3, VG4, e naturais VG0, BF2 e BF3.

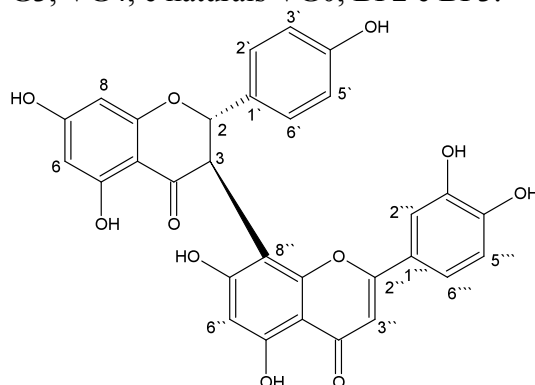


Figura 1 – Estrutura molecular do composto VG0 contendo 7 hidroxilas cada uma localizadas nas posições 5, 7, 4', 5'', 7'', 3''' e 4'''.

RESULTADOS/DISCUSSÃO

IC₅₀ é o valor da concentração de um inibidor necessária para reduzir pela metade a atividade enzimática. Portanto, quanto menor for o valor de IC₅₀, mais eficiente será o inibidor. De acordo com a TABELA 1, em relação à enzima rCPB2.8 o composto mais eficiente foi o VG0 (IC₅₀=0,420μM) o qual contém sete hidroxilas distribuídas nos anéis fenólicos (FIGURA 1), sendo o VG1 o segundo mais eficiente (IC₅₀=0,674μM), contendo cinco grupos acetil no lugar das hidroxilas com exceção das posições 5 e 5'. Em relação à rCPB3 os compostos mais eficientes na inibição foram o VG0 (IC₅₀=0,407μM), VG4 (IC₅₀=0,348μM) contendo cinco grupos butanoil no lugar das hidroxilas com exceção das posições 5 e 5' e BF2 (IC₅₀=0,488μM) contendo um grupo glicosil na posição 4'''. Para a protease mutada na posição 84 com a substituição de um resíduo de histidina por uma tirosina (rH84Y) o composto mais eficiente foi o VG0 (IC₅₀=0,984μM). Para a protease cruzaina o melhor composto foi o VG4 (IC₅₀=8,098μM), porém todos os compostos foram de modo geral menos eficiente na inibição da cruzaina. Em geral, os compostos semi-sintéticos (VG1, VG3 e VG4) apresentaram maior atividade inibitória frente às proteases rCPB2.8 e rCPB3, sendo que a modificação de um único resíduo de aminoácido localizado distante do sítio catalítico, em uma alça externa da estrutura, mostrou-se importante no processo de formação do complexo enzima-inibidor. Além disso, as diferenças de atividade para um mesmo inibidor, possivelmente, deve-se às diferenças dos resíduos de aminoácidos apresentados pelas proteases em função das substituições de Asn⁶⁰, Asp⁶¹ e Asp⁶⁴ da rCPB2.8 para Asp⁶⁰, Asn⁶¹ e Ser⁶⁴ para a rCPB3. Como esses resíduos localizam-se em uma α-hélice da parede do sítio catalítico, as trocas dos aminoácidos podem levar a modificações na distribuição de cargas e conseqüentemente alterar o processo de interação enzima-inibidor, refletindo nas diferenças de atividade de um mesmo

composto para a rCPB2.8 e sua isoforma rCPB3. Além disso, as cadeias carbônicas (metil, acetil ou butanoil) adicionadas nas posições de algumas hidroxilas aumentarem a hidrofobicidade dos compostos semi-sintéticos. Outro fator é que a presença dos grupos glicosil nas posições 4'' no composto natural BF2 e na posição 7'' para o composto natural BF3 possam interferir na associação enzima-inibidor ocasionando aumento do IC₅₀ principalmente em relação ao compostos naturais para as proteases estudadas.

TABELA 1. Valores de IC₅₀ e Ki determinados para as enzimas CPB2.8 e cDNA

Biflavonóide	IC ₅₀ (µM)			
	rCPB2.8	rCPB3	rH84Y	Cruzaína
VG0-3	0,420	0,407	0,984	9,656
VG1-4	0,674	1,154	29,100	539,816
VG3-5	1,266	1,347	22,639	234,967
VG4-6	1,012	0,348	12,547	8,098
BF2-1	2,437	0,488	4,419	50,326
BF3-2	4,507	3,337	26,589	119,201

CONCLUSÕES

Doenças causadas por tripanosomatídeos são enfermidades típicas de países pobres ou subdesenvolvidos que são negligenciadas pelas indústrias farmacêuticas. Nesse contexto, a busca de drogas preferencialmente de baixo custo é de relevância fundamental para suprir a necessidade de uma população de baixa renda acometida pelas enfermidades causadas por *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania mexicana*. Com uma forte presença da medicina popular através da utilização de plantas ditas medicinais, a busca de novas moléculas a partir de compostos naturais torna-se um meio relevante no desenvolvimento de possíveis drogas no combate a doenças parasitárias. Assim, os biflavonóides aqui em estudo mostraram potente atividade inibitória sobre as proteases consideradas fator de virulência na doença de Chagas e leishmaniose. Visto que esses compostos terão como objetivo inibir enzimas de tripanosomatídeos possivelmente contidas nos parasitas localizados em macrófagos do hospedeiro é importante avaliar não somente sua eficiência de inibição, como também avaliar de que forma o organismo irá reagir com a essas substâncias. A reação desejada é que ocorra a absorção dos inibidores pelas células. Sendo assim, deve-se levar em conta a característica central na arquitetura de membranas biológicas, a dupla camada lipídica, que atua como uma barreira impedindo a passagem de moléculas polares e íons. Deste modo, o inibidor que se apresentar mais hidrofóbico será mais facilmente absorvida pela célula, como é o caso do biflavonóide VG4, que, além de ser um bom inibidor para as enzimas rCPB2.8, rCPB3 e cruzaína, também possui cadeias ramificadas de grupos butanoil, tornando-o mais apolar. Em relação à enzima rCPB2.8, o inibidor mais promissor é o biflavonóide VG1, que apresenta acetil em suas extremidades e alta efetividade na inibição. Assim, compostos naturais biflavonoídicos podem se tornar fontes importantes no desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRET, A.J.; KIRSHKE, H. (1981), *Methods Enzymol.* 80, 535–561.

COOMBS, G.H. (1982) *Parasitology*. (84) 149-155.

EAKIN, A.E.; MILLS, A.A.; HARTH, G.; MCKERROW, J.H; CRAIK, C.S. (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 7411–7420.

II, K.; ITO, H.; KOMINAMI, E.; HIRANO, A. (1993) *Virchows Arch A* 423: (3) 185-194.

LOCKWOOD, B.C.; NORTH, M.J.; SCOTT, K.I.; BREMMER, A.F.; COOMBS, G.H. (1987) *Mol Biochem Parasitol* (24) 89-95.

NORTH, M.J.; COOMBS, G.H. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* (3) 293-300.

PETERSON, J.; DWYER J. (1998). *Nutrition Research*, 18(12):1995- 2018.

ROBERTSON, C.D.; COOMBS, G.H. (1992) *FEMS Microbiol Lett.* (94) 127-132.

SANDERSON, S.J.; POLLOCK, K.G.; HILLEY, J.D.; MELDAL, M.; HILAIRE, P.M.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. (2000). *Biochemical. J.* 347.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos pelo suporte financeiro dado pela FAEP, FAPESP, CNPq e FAPEMIG.