

CARACTERIZAÇÃO DE BENZOFENONAS DERIVADAS DE GUTIFERONA-A COMO INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Fernanda Cardoso Amador¹; Marcelo Henrique dos Santos²; Wagner Alves de Souza Júdice³

Graduanda do curso de Química; fcardosoamador@hotmail.com¹

Professor da Universidade Federal de Viçosa, marcelo_hs@yahoo.com.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; wagnerjudice@gmail.com³

Area do conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: cisteíno-protease, benzofenona, Gutiferona-A, tripanossomatídeo.

INTRODUÇÃO

As cisteíno proteases desempenham importante papel no metabolismo proteico celular, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, na degradação de proteínas de matriz extracelular e estão envolvidas em muitas patologias como, por exemplo, em todas as etapas da progressão tumoral, na doença de Alzheimer, na distrofia muscular e na artrite reumatoide (SIEWINSKI, *et. al.*, 1994). O estudo dessas enzimas é importante para o combate das doenças a que elas estão associadas, e para estabelecer as relações entre sequência primária de aminoácidos, estrutura e o papel biológico. Entender o mecanismo de ação e a especificidade primária dessas enzimas é fundamental para o desenho de drogas que possam bloquear sua ação, podendo funcionar como ferramentas no estudo da função dessas proteínas ou como quimioterápicos.

Os protozoários do gênero *Leishmania* contem uma gama de cisteíno proteases (CPs) da família da papaína (C1). Uma característica que despertou o interesse de pesquisadores no começo dos anos 80 foi o alto nível de expressão estágio-reguladora referente às cisteíno proteases (BARRETT *et. al.*, 1998). Na *Leishmania mexicana*, foi observada uma atividade de cisteíno protease consideravelmente maior na forma amastigota de mamíferos que na forma promastigota que vive no inseto vetor (North *et. al.*, 1981). Isso sugere que esta alta atividade de CP é crucial para a sobrevivência do amastigota nos macrófagos do hospedeiro mamífero.

Benzofenonas são compostos orgânicos utilizados como intermediários sintéticos na indústria química e com grande importância na perfumaria, na fotoquímica e no ramo farmacêutico (MARVEL *et. al.*, 1941). Dados de literatura mostram benzofenonas naturais polipreniladas sendo capazes de inibir as cisteíno proteases catepsina B e papaína e as serino proteases catepsina G e tripsina. Tais compostos apresentaram potenciais como produtos naturais como drogas antiproteolíticas no tratamento de doenças nas quais proteases estão envolvidas, como tumores crônicos (MARTINS *et. al.*, 2009). As benzofenonas apresentam um efeito inibitório sobre as proteases trazendo resultados experimentais que podem ser relacionados com certos motivos estruturais estimados cristalograficamente, possibilitando assim relações entre estruturas químicas dos compostos testados e a atividade anti-proteolítica, que são suportadas por ensaios computacionais dos inibidores do alvo macromolecular (MARTINS. 2008).

OBJETIVOS

O presente projeto de iniciação científica tem por objetivo o estudo de uma classe de benzofenonas derivadas de Gutiferona-A como possíveis inibidores de cisteíno proteases de tripanossomatídeos.

METODOLOGIA

A CPB2.8 Δ CTE (versão truncada da CPB2.8 faltando a extensão C-terminal) e suas isoformas CPB3.0 e rH84Y derivadas de biblioteca genômica da *L. mexicana* também são enzimas recombinantes clonadas em vetor de expressão pQE-30 e obtidas a partir de *Escherichia coli* (SANDERSON *et. al.*, 2000) gentilmente cedidas pelo professor Graham H. Coombs da University of Strathclyde, Glasgow. Os compostos sintéticos derivados de benzofenonas da classe das gutiferonas-A, candidatos a inibidores, foram cedidos pelo professor Dr. Marcelo Henrique dos Santos da Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química – CCE. Foram usados para a realização dos ensaios de inibição os compostos sintéticos LFQM-79, LFQM-80, LFQM-81, LFQM-82, LFQM-113, LFQM-114, LFQM-126, LFQM-127, LFQM-128 e LFQM-129. Nos ensaios cinéticos das cisteíno proteases de tripanossomatídeos rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y foi usado tampão acetato de sódio 90,91mM, com 5mM de EDTA, 10% de glicerol, 0,01% de Triton X100, pH 5,5. Alíquotas das enzimas foram pré-incubadas com DTT 1mM durante 10 minutos à 37°C. As concentrações das enzimas para a determinação das velocidades iniciais foram determinadas de modo que a hidrólise do substrato não seja superior a 5%. Os valores de fluorescência obtidos foram convertidos em $\mu\text{M}/\text{min}$ usando uma curva de calibração determinada através da hidrólise total do substrato. Suas hidrólises foram seguidas pela medição da fluorescência (substrato Z-FR-MCA $\rightarrow \lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$) em um espectrofluorímetro Hitachi F2500. Os parâmetros cinéticos são determinados por progressão não-linear usando o programa Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltda). Os ensaios de inibição das proteases foram similares aos ensaios de hidrólise de substratos, entretanto, após a ativação enzimática e medição da atividade inicial das enzimas, procedeu-se a adição de concentrações crescentes de inibidor até a não observação da redução da atividade enzimática em que a velocidade da reação estabilizou. Com os dados adquiridos, calculou-se o IC_{50}

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a **TABELA 1**, pode-se verificar qual a concentração para a inibição de 50% da atividade enzimática da rCPB2.8, com relação a cada composto. Esta tabelao foi elaborado com base nos dados experimentais, avaliando-se as curvas obtidas.

Dentre estes compostos, a benzofenona LFQM-113 ($\text{IC}_{50} = 0,15 \pm 0,01 \mu\text{M}$) foi a mais eficiente na inibição da rCPB2.8. Apesar do composto LFQM-81 apresentar a menor lipofilicidade expressa em $\text{cLogP} (\text{oct}/\text{wat})$ (DIAS *et. al.*, 2012) foi o composto LFQM-113, com a segunda menor lipofilicidade, o mais potente na inibição da rCPB2.8.

Igualmente à inibição da rCPB2.8, o composto LFQM-113 também foi o mais potente na inibição da rCPB3.0 com $\text{IC}_{50} = 0,40 \pm 0,04 \mu\text{M}$ (**TABELA 1**). Além disso, o composto LFQM-126 foi o pior para ambas as cisteíno protease de tripanossomatídeos (rCPB2.8 e rCPB3.0).

Em termos estruturais, as diferenças moleculares entre a rCPB2.8 e rCPB3.0 são os resíduos nas posições 60, 61 e 64 os quais estão localizados em uma alfa-hélice que forma uma das paredes do sítio ativo. Na rCPB2.8 temos os resíduos asparagina, aspártico, aspártico, nestas posições e na rCPB3.0 são aspártico, asparagina e serina (MOTTRAM *et. al.*, 1997).

As proteases rCPB2.8 e rCPB3.0 foram capazes de discriminar as estruturas dos compostos LFQM 79, 80 e 82 foram possivelmente devido as diferenças dos resíduos

anteriormente mencionadas o que implica que a alfa-hélice contendo os resíduos 60, 61 e 64 esteja envolvida na interação dos compostos LFQMs.

Diferentemente das CPBs rCPB2.8 e rCPB3.0, a enzima mutante rH84Y, que é similar à rCPB3.0 com substituição da histidina da posição 84 por uma tirosina, o composto mais potente foi FLQM-114 com $IC_{50} = 1,45 \pm 0,09 \mu M$ (**TABELA 1**).

Tabela 1 . IC_{50} para as enzimas rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y contra os compostos benzofenônicos LFQMs.

COMPOSTO	IC_{50}		
	rCPB2.8	rCPB3.0	rH84Y
LFQM-79	$0,51 \pm 0,02$	$24,28 \pm 0,70$	$23,26 \pm 0,79$
LFQM-80	$6,65 \pm 0,13$	$22,91 \pm 1,75$	$26,10 \pm 1,16$
LFQM-81	$0,41 \pm 0,03$	$0,65 \pm 0,08$	$3,54 \pm 0,04$
LFQM-82	$0,32 \pm 0,00$	$2,41 \pm 0,06$	$1,81 \pm 0,05$
LFQM-113	$0,15 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,04$	$2,70 \pm 0,05$
LFQM-114	$2,37 \pm 0,10$	$1,45 \pm 0,09$	$9,40 \pm 0,69$
LFQM-126	$28,58 \pm 1,47$	$46,00 \pm 2,32$	$32,20 \pm 0,59$
LFQM-127	$9,54 \pm 0,31$	$20,39 \pm 0,60$	$21,99 \pm 0,48$
LFQM-128	$3,40 \pm 0,08$	$1,56 \pm 0,08$	$6,99 \pm 0,12$
LFQM-129	$10,77 \pm 0,23$	$13,79 \pm 1,23$	$14,33 \pm 0,32$

Analisando os compostos 79 e 80, essas benzofenonas foram mais efetivas na inibição da rCPB2.8 do que a rCPB3.0, entretanto, os valores de IC_{50} na inibição da rCPB3.0 foram muito similares à inibição da rH84Y.

A tirosina 84 está localizada na superfície da estrutura da protease rH84Y e longe do sítio catalítico o que possivelmente não interfere na atividade inibitória do LFQM-79, 80, 126, 127 e 129 para rCPB3.0 e rH84Y. Por outro lado, o composto LFQM113 foi discriminado entre essas proteases, pois a substituição da histidina da rCPB3.0 pela tirosina na rH84Y promoveu uma redução no potencial inibitório em quase sete vezes.

Deste fato podemos analisar duas situações, uma em que o LFQM-113 está ligando ao sítio catalítico e este sítio sofreu a influência da substituição do resíduo, ou o resíduo 84 faça parte de um sítio alostérico de ligação desta benzofenona. Contudo, estudos complementares de determinação de mecanismo de inibição e modelagem molecular poderiam responder estes apontamentos.

CONCLUSÃO

Todos os compostos benzofenônicos estudados neste projeto de pesquisa demonstraram possuir um potencial de inibição enzimática das cisteíno proteases utilizadas (rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y).

As substituições dos resíduos de aminoácidos nas posições 60, 61 e 64 e 84 promoveram modificações nas cisteíno proteases de tripanossomatídios que permitiram a discriminação entre alguns compostos benzofenônicos.

As diferenças estruturais dos compostos que acarretaram alterações na lipofilicidade também ocasionaram modificações nos potenciais inibitórios das proteases rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y.

AGRADECIMENTOS: FAEP, FAPESP, CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETT AJ, RAWLINGS ND & WOESSNER JF. (1998) in Handbook of Proteolytic enzymes (BARRETT AJ, RAWLINGS ND & WOESSNER JF Eds.) – CYSTEINE – *Academic Press*.

DIAS, K. S.; JANUÁRIO, J. P.; D' DEGO, J.L.; DIAS, A. L.; DOS SANTOS, M. H.; CAMPS, I.; COELHO, L. F.; VIEGAS, C. JR. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives, *Bioorg Med Chem*. v20(8), p. 2713-2720, 2012

MARTINS, F. T.; ASSIS, D.M.; SANTOS, M.H.; CAMPOS, I.; VELOSO, M.P.; JULIANO, M.A.; ALVES, L.C.; DORIGUETTO, A.C. (2009). Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(3):1230-1239, 2009.

MARTINS, F. T. (2008) Estudo cristalográfico de benzofenonas preniladas extraídas de sementes e frutos de *Rheedia brasiliensis*: estrutura cristalina e relação estrutural-atividade. Alfenas, **Dissertação** Universidade Federal de Alfenas.

MARVEL, C. S.; SPERRY, W. M. Coll. Benzophenone. *Organic Syntheses*, v. 1, p. 95, 1941.

MOTTRAM J. C., FRAME M. C., BROOKS D. R., TETLEY L., HUTCHISON J. E., SOUZA A.E. & COOMBS G. H. *J. Biol Chem.* The multiple *cpb* cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes which differ in their stage-regulation and substrate preferences 272:14285-14293, 1997.

NORTH, MJ. E Coombs, GH. Proteinases of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes: analysis by gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 293-300, 1981.

SANDERSON, S.J., POLLOCK, K.G., HILLEY, J.D., MELDAL, M., ST. HILAIRE, P.M., JULIANO, M.A., JULIANO, L., MOTTRAM, J. C. & COOMBS, G. H. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *Biochem. J.* 347(Pt 2):383-388, 2000.

SIEWINSKI, M., GUTOWICZ, J., KIELAN, W., BOLANOWSKI, M. Cysteine peptidase inhibitors and activator(s) in urine of patients with colorectal cancer. *Oncology*, 51(5):446-449, 1994.