

DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES INDIVIDUAIS DE INIBIÇÃO k_3 e k_{-3} DE COMPOSTOS BIFLAVONÓIDES FRENTE ÀS PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Amanda de Carvalho Dosatti¹, Vanessa Silva Gontijo², Marcelo Henrique dos Santos³,
Wagner Alves de Souza Júdice⁴

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

Estudante de pós-graduação da UFMG; email: vanessagontijo@yahoo.com.br²

Professor Adjunto da UFV; email: Marcelo_hs@yahoo.com.br³

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com⁴

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Cisteíno-Proteases, Biflavonóides, Tripanossomatídeos

INTRODUÇÃO

As cisteíno proteases desempenham importante papel no metabolismo protéico celular, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, na degradação de proteínas de matriz extracelular e estão envolvidas em muitas patologias. Dentre as várias cisteíno proteases (CPs), algumas da família da papaína estão presentes nos Protozoários do gênero *Leishmania*. Essas CPs demonstraram uma característica que despertou o interesse de pesquisadores no começo dos anos 80, que é o alto nível de expressão estágio-reguladora (Barret et al, 1998). 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, 1981; Coombs, 1982). Isto sugere que esta alta atividade de CP é de importância crucial para a sobrevivência do amastigota nos macrófagos do hospedeiro mamífero. No caso da Cruzipaina (Schaffer, 1988), a cisteíno protease majoritária do *Trypanosoma cruzi*, foi identificada como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da doença de chagas (Meirelles, 1992; Harth, 1993) e é reconhecida como um fator de virulência do *T. cruzi*. Essa enzima está associada a vários processos vitais do parasita, tendo um papel crucial durante a infecção das células hospedeiras, na replicação e no metabolismo. Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos.

OBJETIVOS

Nosso objetivo foi determinar o mecanismo de inibição do composto VG0 sobre a rCPB2.8 e determinação das constantes individuais de inibição k_3 e k_{-3} .

METODOLOGIA

Ensaio de hidrólise de substratos fluorescentes: a enzima rCPB2.8 foi incubada com tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,5, 200mM de NaCl, com 2,5mM de ditiotreitól (ativador de cisteíno proteases) por 10min a 35°C. Após ativação da enzima, foi adicionado sonda fluorogênica Z-FR-MCA em concentração 10x o Km juntamente com o composto biflavonóide. A hidrólise do substrato foi acompanhada pela medição da fluorescência (λ_{ex} 360nm e λ_{em} 480nm) em um espectrofluorímetro Hitachi F2500 como descrito previamente (Chagas et al, 1990; Oliveira et al, 1992). Para a

determinação das constantes de associação e dissociação do inibidor, k_3 e k_{-3} , respectivamente, os experimentos foram realizados em diferentes concentrações do inibidor. Os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não linear usando o programa Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltda) (Wilkinson, 1961).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente verificou-se se os compostos biflavonóides apresentavam supressão da fluorescência do grupo MCA. Para verificar essa supressão foram realizados experimentos com $0,4\mu\text{M}$ de MCA livre com diferentes concentrações do composto VG0 no espectrofluorímetro Hitachi F2500, obtendo-se a figura 1:

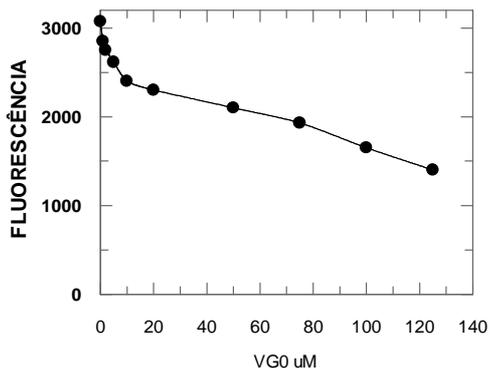


Figura 1: Nível de fluorescência conforme quantidades crescentes de composto biflavonóide (VG0).

Foi constatado com esse experimento que concentrações de inibidor menores do que $5\mu\text{M}$ tem uma supressão da fluorescência de até 15%, e conforme é aumentada a concentração do composto, a supressão chega até 54,5% com $125\mu\text{M}$ do VG0. Em função desse efeito, os valores de velocidade residual da ação dos biflavonóide foram corrigidos. Na análise temporal do efeito inibitório do composto sobre a enzima realizada no espectrofluorímetro F2500, foram feitos gráficos com as variáveis tempo e o logaritmo neperiano (Ln) das velocidades relativas (velocidades corrigidas devido à supressão) em função da velocidade inicial [$\text{Ln}(V/V_0) \times \text{tempo}$] e quantidade utilizada de inibidor. Os dados obtidos foram inicialmente analisados por equação linear $y = ax + b$, em que y é o valor de $\text{Ln}(V/V_0)$ e x a variável tempo. Os coeficientes angulares (“slope”) obtidos para cada uma das retas foram plotados de acordo com a concentração do composto VG0, obtendo-se o gráfico k_{obs} vs concentração de VG0.

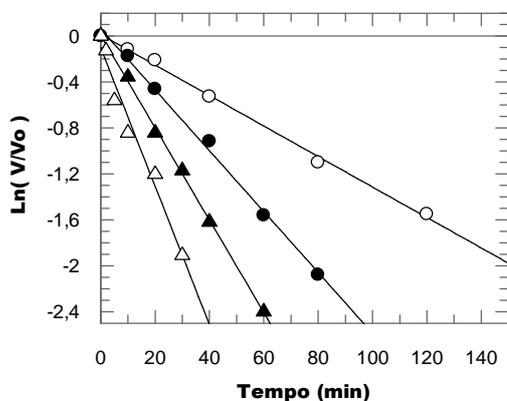


Figura 2: Análise Temporal do efeito do composto biflavonóide em função do tempo para a cisteíno protease rCPB2.8.

Concentrações crescentes de inibidor (0,2-0,4-0,8-1,2 μ M) foram incubadas na presença de rCPB2.8 e posteriormente a atividade residual mensurada utilizando-se a sonda fluorescente Z-FR-MCA.

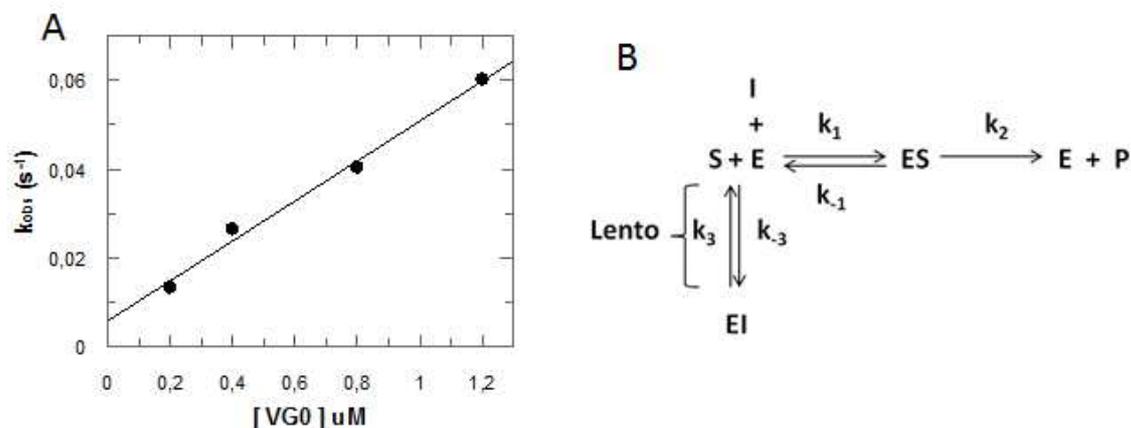


Figura 3: Plote para de terminação da constante k_3 e k_{-3} e mecanismo de inibição da rCPB2.8 pelo VG0
A: Plote dos coeficiente angulares em função da concentração de inibidor para a enzima rCPB2.8.
B: Esquema do mecanismo de inibição da rCPB2.8 pelo biflavonóide VG0.
 k_3 : constante de associação enzima/inibidor, k_{-3} : constante de dissociação enzima/inibidor, k_1 : constante de associação enzima/substrato, k_{-1} : constante de dissociação enzima substrato, k_2 : constante catalítica

Os coeficientes angulares das retas da figura 3A, denominados k_{obs} , foram plotados em função das concentrações do composto VG0 para a cisteíno protease rCPB2.8 de *L. mexicana* utilizando-se o programa Grafit 5.0. Coeficiente angular calculado: “Slope”=0,0450 \pm 0,0032 s^{-1}/μ M, intercepto= 0,0058 \pm 0,0024 s^{-1} . Em função dos dados obtidos a partir dos plotes da figura 2 e figura 3, foi possível determinar a constante k_3 correspondente à constante de associação enzima/inibidor de acordo com o mecanismo de inibição abaixo descrito para os resultados obtidos.

A constante k_3 é dada pelo coeficiente angular (“slope”) da reta da figura 3. Em que k_3 (s^{-1}) é a constante de associação enzima/inibidor, S (μ M) a concentração de substrato e K_m (μ M) a constante de afinidade Michaelis-Menten. Experimentalmente, de acordo com os dados de S e K_m calculamos o valor de $k_3=0,5689\mu$ M $^{-1}.s^{-1}$. Os resultados mostraram que o processo de interação rCPB2.8 e o composto biflavonóide VG0 ocorre de forma lenta e reversível (figura 3B) comparativamente aos resultados obtidos por Baici et al (2009). Além da determinação da constante k_3 , foi possível a determinação da constante k_{-3} , que corresponde ao intercepto da reta no eixo Y (figura 3), apresentando o valor de $k_{-3}=0,0058\pm 0,0024s^{-1}$. De acordo com o mecanismo, K_i (constante de inibição) é dada por $K_i=k_{-3}/k_3$ assim, foi determinado $K_i=0,01\mu$ M. Dessa forma, VG0 atua sobre a enzima rCPB2.8 como um inibidor reversível competitivo com K_i na ordem de 10nM (nano molar).

CONCLUSÕES

Verificou-se que os compostos biflavonóides são capazes de efetuar a supressão de fluorescência do MCA. Foi possível constatar através dos experimentos que concentrações de inibidor menores do que 5 μ M tem uma supressão da fluorescência de até 15%, e conforme é aumentada a concentração do composto, a supressão chega até 54,5% com 125 μ M do VG0.

Os dados de velocidades obtidos foram corrigidos para a análise temporal do efeito do composto biflavonóide em função do tempo para a cisteíno protease rCPB2.8. Foram

calculados os valores das constantes individuais de inibição de associação $k_3=0,5689\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ e de dissociação $k_{-3}=0,0058\pm 0,0024\text{s}^{-1}$.

Verificou-se que o composto VG0 apresenta um processo de interação com a enzima rCPB2.8 de forma lenta (slow-binding) de forma reversível e competitiva, com K_i na ordem de 10nM (nano molar).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAICI, A; SCHENKER, P; WÄNCHTER, M; RÜEDI, P; (2009) *Chemistry & Biodiversity*. Vol. 6: 261-281.

CHAGAS, J.R., JULIANO, L. & PRADO, E.S. (1990), *Anal. Biochem.* 192, 419–425.

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

BARRETT AJ, RAWLINGS ND & WOESSNER JF. (1998) in Handbook of Proteolytic enzymes (Barrett AJ Rawlings ND & Woessner JF Eds.) - CYSTEINE - *Academic Press*, London, UK, 744-797.

MEIRELLES MN, JULIANO L, CARMONA E, SILVA SG, COSTA EM, MURTA AC, SCHARFSTEIN. (1992). *J Mol Biochem Parasit.* 52: (2) 175-84.

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

HARTH G, ANDREWS N, MILLS AA, ENGEL JC, SMITH R, MCKERROW JH. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* 58:17-24.

OLIVEIRA, M.C.F., HIRATA, I.Y., CHAGAS, J.R., BOSCHCOV, P., GOMES, R.A.S., FIGUEIREDO, A.F.S. & JULIANO, L. (1992), *Anal. Biochem.* 203, 39–46.

SCHAFFER, M.A. & FISCHER, R.L. (1988). *Plant Physiol.* 87, 431–436.

WILKINSON, G.N. (1961), *Biochem. J.* 80, 324–332.