

CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS POR COMPOSTOS NATURAIS E SEMI-SINTÉTICOS DERIVADOS DE BIFLAVONAS

Amanda de Carvalho Dosatti¹, Diego Magno Assis², Luiz Juliano², Vanessa Silva Gontijo³, Marcelo Henrique dos Santos⁴, Wagner Alves de Souza Júdice⁵

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

Estudante de pós-graduação da UNIFESP²

Estudante de pós-graduação da UNIFAL³

Professor Adjunto da UNIFAL⁴

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com⁵

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Cisteíno-Proteases, Cruzaína, rCPB2.8, 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 (Ii 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 permitindo atuarem sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades agem 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 estabelecer os possíveis mecanismos de inibição das enzimas rCPB2.8, rCPB3, rH84Y e cruzaína pelos compostos VG0 e VG4.

METODOLOGIA

As enzimas rCPB2.8 e suas isoformas rCPB3 e rH84Y foram incubadas com tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,5, com 2,5mM de ditiotreitol por 5 minutos a 35°C e as reações iniciadas pela adição de substrato. As hidrólises foram acompanhadas pela medição da fluorescência (substrato Z-FR-MCA \rightarrow λ_{ex} 360nm e λ_{em} 480nm) em espectrofluorímetro Hitachi F2500.

As enzimas foram ensaiadas utilizando a metodologia de Michaelis-Menten para saturação de substrato para cada concentração de inibidores VG0 e VG4 definidas. Os

dados coletados foram analisados no programa Grafit-5.0 e os plots dos recíprocos e os respectivos replotes foram construídos.

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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

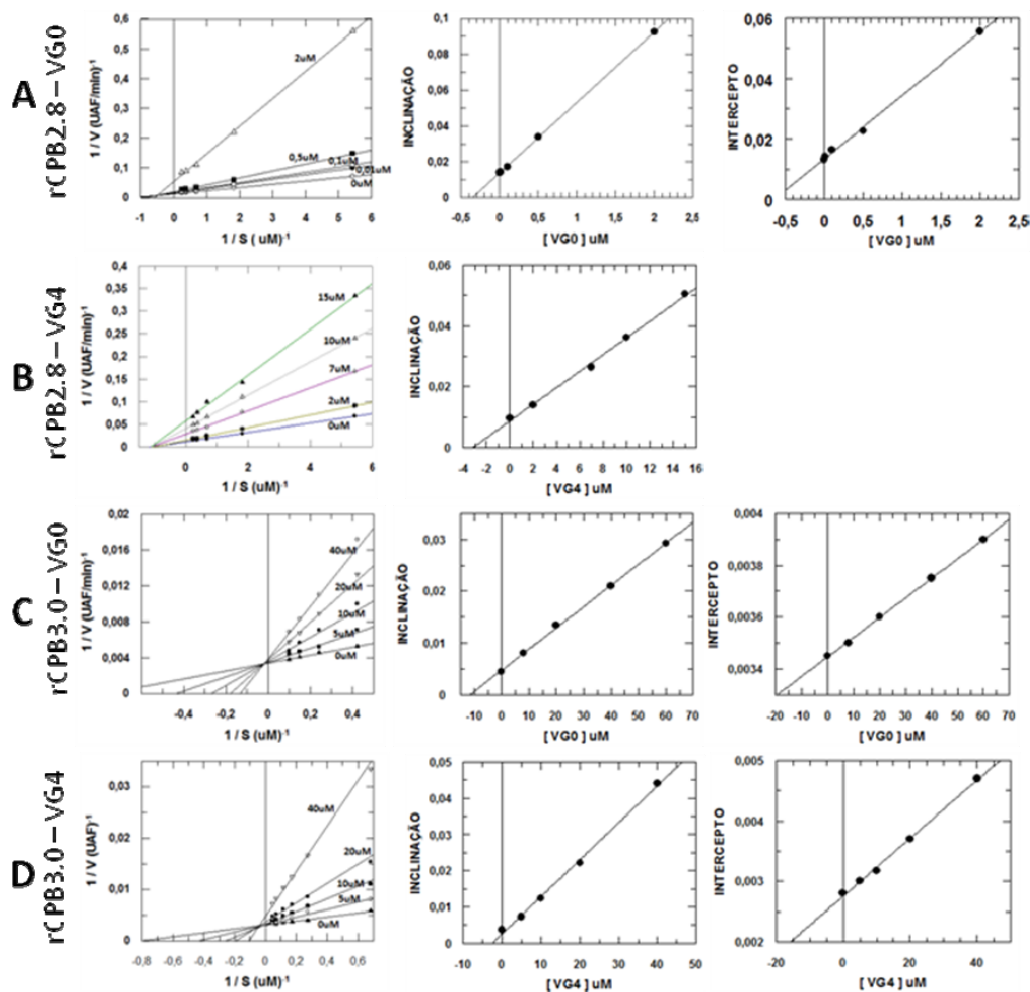


FIGURA 1: Plots Lineweaver-Burk e replotes das inibições das enzimas rCPB2.8 e rCPB3.0 pelos compostos VG0 e VG4. A: rCPB2.8 e VG0; B: rCPB2.8 e VG4; C: rCPB3.0 e VG0; D: rCPB3.0 e VG4.

Os resultados mostraram que na inibição da rCPB2.8 pelo VG0 (Figura 1A) temos inibição não competitiva tipo mista não produtiva e pelo VG4 (Figura 1B) inibição não competitiva simples ($K_i=3,2\mu\text{M}$). Os compostos VG0 ($K_i=12,2\mu\text{M}$) e VG4 ($K_i=2,5\mu\text{M}$) também apresentaram inibição não competitiva tipo mista não produtiva para a rCPB3.0 (Figura 1C e D) (Figura 3B).

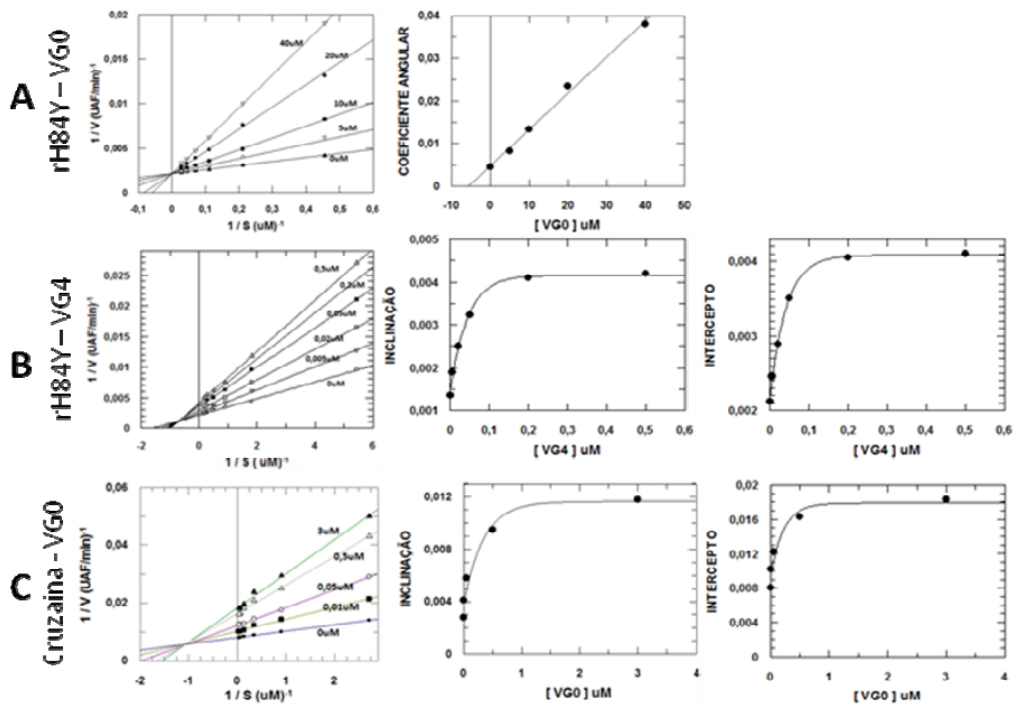


FIGURA 2: Plotes Lineweaver-Burk e replotes das inibições das enzimas rH84Y e Cruzaina pelos compostos VG0 e VG4. A: rH84Y e VG0; B: rH84Y8 e VG4; C: Cruzaina e VG0.

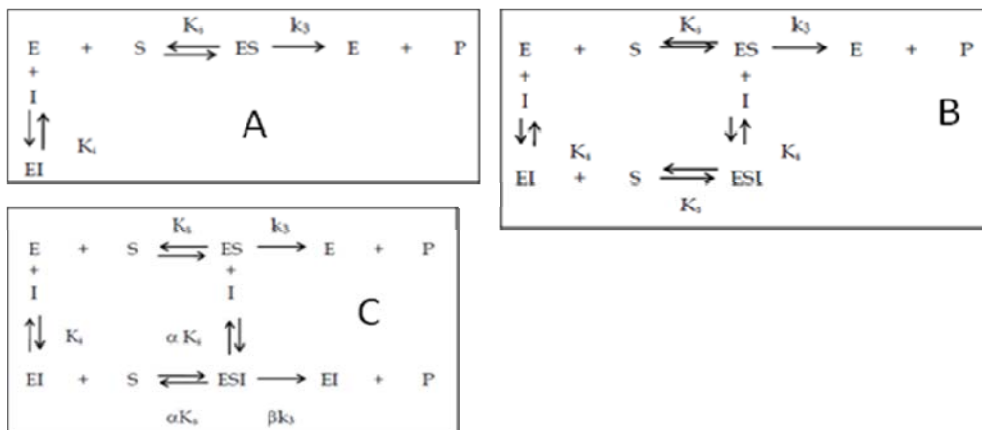


Figura 3: Mecanismo de inibição das enzimas de tripanossomatídeos pelos compostos VG0 e VG4. A: Inibição competitiva para enzima rH84Y com o composto VG0; B: Inibição não-competitiva para as enzimas rCPB2.8 com os compostos VG0 e VG4 e rCPB3.0 com os compostos VG0 e VG4; C: Inibição mista com ESI produtivo para as enzimas rH84Y com composto VG4 e cruzaina com o composto VG0.

Para a isoforma rH84Y, o composto VG0 apresentou inibição competitiva com $K_i=5,2\mu\text{M}$ (Figura 2 A e Figura 3A). Por outro lado, o composto VG4 apresentou inibição mista com complexo ESI produtivo (Figura 2B e Figura 3C) em função dos replotes hiperbólicos. Para cruzaina (Figura 2C), VG0 apresentou inibição mista com EIS produtivo (Figura 3C) também com replotes hiperbólicos.

Essas variações nos mecanismos de inibição bem como nos valores de K_i estão relacionados às modificações nos aminoácidos nas posições 60, 61, 64 e 84 entre as isoformas de CPBs e à modificação na hidrofobicidade dos compostos biflavonóides atuando como fatores fundamentais nas alterações do comportamento da relação enzima-inibidor.

CONCLUSÕES

Doenças causadas por tripanossomatídeos 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.

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.