

CARACTERIZAÇÃO DE BENZOFENONAS NA INIBIÇÃO DE CISTEÍNO PROTEASES DE *Leishmania mexicana* CPB2.8 E SUAS ISOFORMAS

Gabriel Garcia Okuda¹; Marcelo Henrique dos Santos²; Luiz Juliano³;
Wagner Alves de Souza Judice⁴

Estudante do curso de Medicina da Universidade de Mogi das Cruzes; Email:
Gabriel_okuda@hotmail.com¹

Professor da UNIFAL - Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal²

Professor da UNIFESP do Departamento de Biofísica³

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; Email: wagneras@umc.br⁴

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Cisteíno proteases, *Leishmania mexicana*, benzofenonas, inibidores.

INTRODUÇÃO

Cisteíno proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre aminoácidos de proteínas e peptídeos. Atualmente esta classe de enzimas tem sido estudada como novos alvos terapêuticos para desenvolvimento de novas drogas (DIAS *et al*, 2009). 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. Isto sugere que esta alta atividade de CP é de importância crucial para a sobrevivência do amastigota nos macrófagos do hospedeiro mamífero, sendo que a enzima pode tornar-se alvo para o desenvolvimento de drogas anti-leishmaniais baseadas na sua inibição (NORTH, COOMBS, 1981; ROBERTSON, COOMBS, 1992). Os inibidores são avaliados através de experimentos que levam à geração de gráficos do tipo *concentração x resposta*. A análise por regressão não linear desses gráficos leva à determinação do fator de potência IC50 que permite a análise quantitativa comparativa dentro de uma série de compostos, gerando dados úteis para o estabelecimento de relações entre a estrutura e a atividade. 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 no alvo macromolecular (MARTINS, 2008). Dados de literatura mostram benzofenonas naturais polipreniladas sendo capazes de inibir as cisteíno proteases catepsina B e papaína bem como as serino proteases catepsina G e tripsina. Tais compostos apresentaram potencial como drogas antiproteolíticas no tratamento de doenças nas quais proteases estão envolvidas, como tumores crônicos (MARTINS, 2009).

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo a caracterização de compostos derivados de benzofenonas como possíveis inibidores da Cisteíno Protease Tipo B, rCPB2.8 de *Leishmania mexicana* e suas isoformas rCPB3.0 e rH84Y, envolvidas como fatores de virulências na leishmaniose cutânea.

METODOLOGIA

A enzima rCPB2.8 foi incubada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e ativada com 2,5 mM de ditiotreitól (ativador de cisteíno proteases) por 5 minutos a 35°C e a reação

iniciada pela adição de substrato carboxibenzoil-fenil-arginil ácido metilcoumarínico (Z-FR-MCA). Sua hidrólise foi seguida pela medição da fluorescência do grupo MCA (ácido metilcoumarínico) em comprimentos de onda de excitação λ_{ex} 360 nm e emissão λ_{em} 480 nm em um espectrofluorímetro Hitachi F2500 (CHAGAS, JULIANO, PRADO, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1996; WILKINSON, 1961). Posteriormente à adição do substrato e medição da atividade enzimática na ausência de inibidor obtendo-se a velocidade inicial da reação, foi adicionado inibidor aumentando sua concentração gradativamente até a estabilização do decaimento na atividade enzimática e com os dados adquiridos foi possível determinar o IC_{50} utilizando-se o programa Grafit-5.0. Após os ensaios de determinação dos valores de IC_{50} , os compostos mais ativos foram submetidos aos ensaios cinéticos para determinação do mecanismo de inibição e consequentemente obtenção dos valores das constantes de inibição K_i . O método experimental consiste em medir a velocidade da reação na ausência e na presença de diferentes concentrações de inibidor, em pelo menos cinco concentrações de substrato. Efetuou-se a escolha das concentrações de inibidor com base nos valores de IC_{50} . Os dados coletados originaram os gráficos de duplo recíprocos (plots de Lineweaver-Burk) e através do padrão de intersecção das curvas no plano de coordenadas cartesianas, determinou-se o mecanismo de inibição. Os gráficos dos replotes de interceptos ou inclinação em função da concentração de inibidor determinaram-se os valores das constantes de inibição K_i .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, de acordo com a Tabela 1, as benzofenonas foram mais efetivas na inibição da rCPB3.0 com $\Delta IC_{50}=5,6 \mu M$ do que para as enzimas rCPB2.8 e rH84Y que apresentaram $\Delta IC_{50}=29,2 \mu M$ e $\Delta IC_{50}=90,9 \mu M$, respectivamente. Os ensaios enzimáticos mostram que para a enzima rCPB2.8, o composto CM-B se apresenta como melhor inibidor, com um $IC_{50}=1,8 \pm 0,2 \mu M$. Para a enzima rCPB3.0, o melhor inibidor testado foi o LFQM-121, com um $IC_{50}=1,20 \pm 0,03 \mu M$. Para a enzima rH84Y os compostos LFQM-120 e 121 foram os mais potentes na inibição com IC_{50} de $2,1 \pm 0,2 \mu M$ e $2,1 \pm 0,1 \mu M$, respectivamente.

Tabela 1: Valores de IC_{50} determinados para as enzimas rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y.

Composto	IC ₅₀ (μM)		
	rCPB2.8	rCPB3.0	rH84Y
CM-A	4,65 ± 0,07	3,8 ± 0,3	11,3 ± 0,5
CM-B	1,8 ± 0,2	2,32 ± 0,04	93 ± 8
LFQM-113	4,2 ± 0,3	2,7 ± 0,1	84 ± 4
LFQM-114	21 ± 3	6,8 ± 0,6	24 ± 1
LFQM-115	25 ± 3	3,6 ± 0,2	22 ± 0,8
LFQM-119	31 ± 2	3,2 ± 0,2	46 ± 3
LFQM-120	17 ± 1	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,2
LFQM-121	14,6 ± 0,5	1,20 ± 0,03	2,1 ± 0,1

Condições: Tampão acetato de Sódio 100mM, pH 5,5, DTT 2,5mM, 35°C.

Dos resultados da Tabela 1, optamos em determinar o mecanismo de inibição do composto LFQM-121. A Figura 1 (A a F) mostra os plots dos inversos de inibição das enzimas

rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y e seus respectivos replotes de inclinação em função da concentração de inibidor. A Figura 1A mostra que as retas interseccionam o eixo X em um ponto comum definindo um mecanismo de inibição não competitivo com variação de inclinação e de intercepto e o replote (Figura 1B) permitiu a determinação do $K_i = 0,28 \pm 0,01 \mu\text{M}$. O replote dos interceptos (dados não apresentados) estabeleceu um $\alpha K_i = 0,27 \pm 0,01 \mu\text{M}$, assim temos $K_i = \alpha K_i$. Dessa forma temos LFQM-121 apresentando mecanismo de inibição não competitivo linear simples na inibição da rCPB2.8 (Figura 2A) ligando-se tanto à enzima livre (E) quanto ao complexo enzima-substrato (ES).

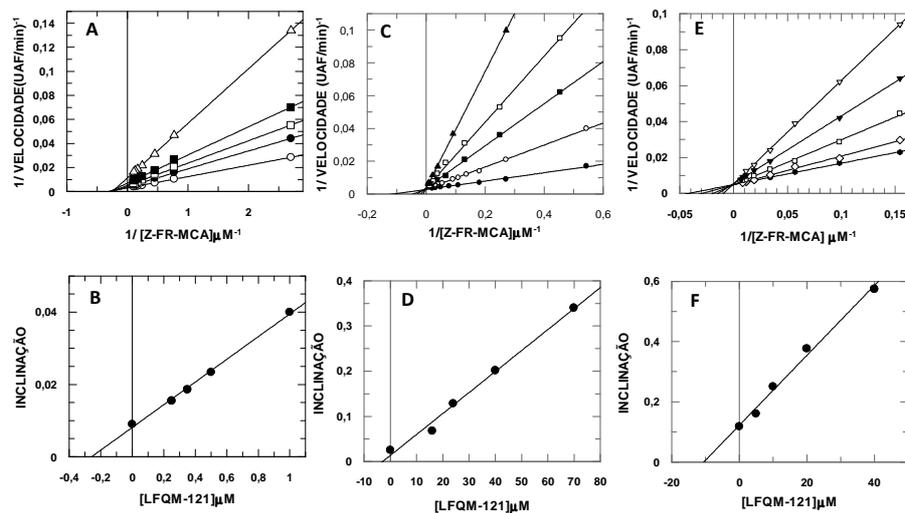


Figura 1 – Cinéticas de inibição das cisteíno proteases de *Leishmania mexicana* pela benzofenona LFQM-121.

A e B correspondem aos Plote dos inversos e replote da inclinação da enzima rCPB2.8 nas concentrações de 0; 0,25; 0,35; 0,5 e 1 μM . $K_i = 0,28 \pm 0,01 \mu\text{M}$.

C e D correspondem aos Plote dos inversos e replote da inclinação da enzima rCPB3.0 nas concentrações de 0; 16; 24; 40 e 70 μM . $K_i = 3,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

E e F correspondem aos Plote dos inversos e replote da inclinação da enzima rH84Y nas concentrações de 0; 5; 10; 20 e 40 μM . $K_i = 10,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$.

A Figura 1C apresenta o plote de inibição da rCPB3.0 no qual as retas interseccionam o eixo Y em um mesmo ponto estabelecendo um mecanismo de inibição competitivo em que não há variação de velocidade máxima e que a partir de seu replote das inclinações (Figura 1D) obteve-se $K_i = 3,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$, sendo assim, LFQM-121 apresenta mecanismo de inibição competitivo linear simples com $\alpha K_i = \infty$ (Figura 2B). Igualmente à Figura 1C, observamos na Figura 1E a intersecção das retas no mesmo ponto do eixo Y na inibição da rH84Y tendo-se assim um mecanismo de inibição competitivo. O replote (Figura 1F) estabeleceu um $K_i = 10,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ e portanto, LFQM-121 apresenta mecanismo de inibição competitivo linear simples com $\alpha K_i = \infty$ (Figura 2B).

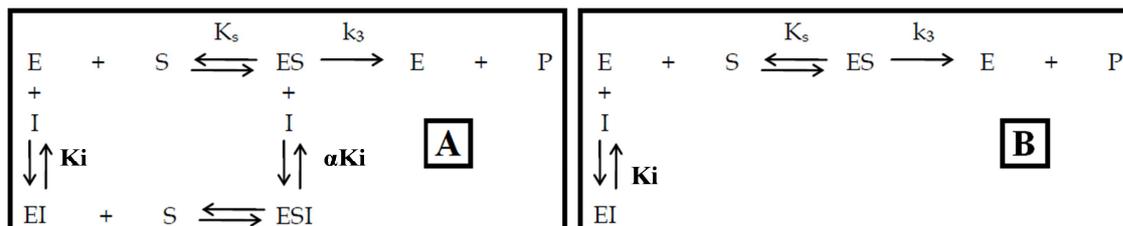


Figura 2 – Modelos de mecanismos de inibição propostos

A: Mecanismo de inibição do LFQM-121 sobre a rCPB2.8 (Não competitivo linear simples);
B: Mecanismo de inibição do LFQM-121 sobre a rCPB3.0 e rH84Y (competitivo linear simples)

CONCLUSÃO

Cisteíno proteases de *Leishmania mexicana* estão envolvidas como fatores de virulência na leishmaniose e estão presentes em 19 cópias gênicas em linha definindo um grupo de 19 isoformas. O gene da CPB2.8 é formado por 14 cópias em tandem diferindo da isoformas rCPB3.0 e rH84Y em alguns poucos aminoácidos. Essas duas isoformas diferem uma da outra no domínio maduro da enzima em somente três posições. rCPB2.8 apresenta os aminoácidos Asn, Asp e Asp nas posições 60, 61 e 64 em uma alça que forma a parede do sítio catalítico e His na posição 84, distante deste sítio. Por outro lado rCPB3.0 possui Asp⁶⁰, Asn⁶¹, Ser⁶⁴ e His⁸⁴ e a enzima rH84Y difere desta última somente na substituição de His⁸⁴ por Tyr⁸⁴. Em função disso, nossos resultados claramente mostram que o aumento da hidrofobicidade das moléculas de benzofenonas (de CM-A para LFQM-121) pela adição de cadeias carbônicas modifica o potencial inibitório sendo que no caso da rCPB2.8 os compostos menos hidrofóbicos (CM-A, CM-B e LFQM-113) foram mais potentes na inibição. Por outro lado, a substituição dos aminoácidos nas posições observados na rCPB3.0 basicamente eliminou essa seletividade por hidrofobicidade. Interessantemente, a rH84Y cuja diferença com a rCPB3.0 é a troca da His⁸⁴Tyr levou a enzima ser mais suscetível á inibição pelas moléculas mais hidrofóbicas (LFQM-120 e 121). Contrariamente ao observado na varredura do potencial inibitório, as constantes de inibição K_i para as três enzimas mostrou que o composto LFQM-121 apresenta aproximadamente 11 e 38 vezes mais afinidade pela rCPB2.8 do que pelas enzimas rCPB3.0 e rH84Y, respectivamente. Neste trabalho mostramos que benzofenonas sintéticas são capazes de inibir cisteíno proteases de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* servindo como moléculas para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. **Analytical Biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 419 – 425, feb. 1991
- DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectiva no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 10 novembro 2009.
- MARTINS, F. T. **Estudo cristalográfico de benzofenonas preniladas extraídas de sementes e frutos de *Rhedia brasiliensis*: estrutura cristalina e relação estrutura-atividade**. Alfenas, 2008. Dissertação Universidade Federal de Alfenas.
- MARTINS, F.T.; ASSIS, D.M.; SANTOS, M.H.; CAMPS, I.; VELOSO, M.P.; JULIANO, M.A.; ALVES, L.C.; DORIGUETTO, A.C. Antônio C. Doriguetto. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1230–1239, 2009.
- NORTH, M. J.; COOMBS, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes: analysis by gel electrophoresis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 3, p. 293-300, 1981

ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. ;NORTH, M. J.; MOTTRAM, J. C. Parasite cysteine proteinases. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 6, p.99-118, 1996.