

Nitroestirenos como novos inibidores enzimáticos

Renan Antonielli Uzum, (IC)^{1*} Fabiana M. Alves(PG),² Maria A. Juliano(PQ),² Luiz Juliano(PQ)² e Rodrigo L.O.R. Cunha (PQ)^{1,2*}

e-mail: renan.uzum@ufabc.edu.br, rodrigo.cunha@ufabc.edu.br

¹ Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil;

² Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Palavras Chave: nitroestirenos, proteases, inibidores enzimáticos, síntese orgânica

Introdução

As proteases ou enzimas proteolíticas constituem um dos mais amplos e importantes grupos de enzimas, catalisam a hidrólise seletiva de ligações peptídicas e são divididas em quatro grupos principais, aspartil-, serina-, cisteína- e metalo-proteases.¹ De modo geral, as proteases participam de uma grande variedade de processos fisiológicos, que incluem a reciclagem de proteínas, a digestão, a coagulação sanguínea, dentre outras. Sua atividade descontrolada, desregulada ou indesejada ocorre em diversos quadros patológicos como enfisema, derrames, infecções por parasitas ou vírus, câncer, mal de Alzheimer, inflamação e artrite.² Em particular, o papel biológico das cisteína-proteases é bastante amplo e algumas delas, como as catepsinas S e K, são consideradas alvos terapêuticos.³ Por isso, o desenvolvimento de inibidores para estas enzimas abre perspectivas para novos quimioterápicos e também para novas ferramentas para o estudo da biologia destas enzimas.

Entre as classes de inibidores irreversíveis para cisteína proteases estão os aceptores de Michael, entre eles o único grupo aceptor de elétrons não descrito é o grupo nitro.^{3b} Neste trabalho, foi realizada a síntese de uma coleção de nitroestirenos e a inibição da papaína, arquétipo de cisteína proteases, foi caracterizado.

Resultados e Discussão

Os nitroestirenos foram preparados a partir da reação de Claisen-Schmidt sendo obtidos em rendimentos de moderado a bons após purificação por recristalização (Figura 1).⁴

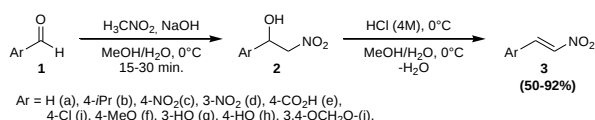


Figura 1. Reação de Claisen-Schmidt⁴. Os grupos R foram: 2,4-dicloro, 4-flúor, 2-nitro e 4-nitro.

A atividade inibitória da papaína pelos nitroestirenos foi avaliada pela determinação das constantes de velocidade de inibição pelo método contínuo.⁵ A atividade enzimática foi determinada continuamente acompanhando a hidrólise do substrato fluorogênico, Cbz-Phe-Arg-AMC em tampão de fosfato de sódio (50mM) contendo EDTA (5mM) a pH 6,5. A hidrólise do substrato foi monitorada na ausência e na presença de concentrações variadas de **3a-j**. A figura 2 ilustra as curvas de progresso das reações e o replote das constantes de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) em função das concentrações dos inibidores para a determinação das constantes de velocidade de segunda-ordem para a inativação da papaína (k_2). As constantes de velocidade de segunda ordem dos nitroestirenos foram da ordem de 100 a 5100 M⁻¹s⁻¹.

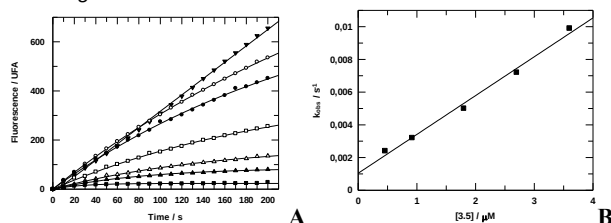


Figura 2. Progresso da reação de inibição com **3d** da papaína com o tempo (A) Cinética de inibição da papaína com o tempo. control (▼), 0.46 (○), 0.92 (●), 1.8 (□), 2.7 (Δ), 3.6 (▲), and 5.5 (■) μM of **3d**. (B) Constantes de velocidade de primeira-ordem da inativação da papaína em função da concentração de **3d**.

Além da caracterização cinética, a inibição irreversível da papaína pelos nitroestirenos foi caracterizada por cromatografia de exclusão da papaína e do aduto papaína/**3d** (Figura 3).

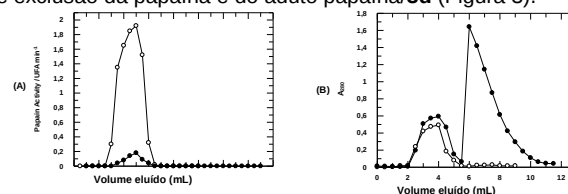
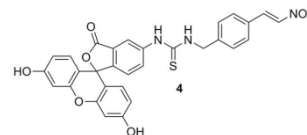


Figura 3. Papaína ativada foi incubada em tampão (pH 6.8) na presença e na ausência (○) e na presença (●) de **3a** (50μM) e então eluída em uma coluna com Sephadex G-25. Frações de 500μL foram coletadas e a atividade de hidrólise de Cbz-Phe-Arg-AMC (A) e o conteúdo de proteína foi determinado por espectrofotometria no UV-Vis a 280 nm (B).

Ainda, o aduto enzima/inibidor foi caracterizado por RMN bidimensional (HSQC) utilizando um derivado de **3a** marcado com ¹³C no carbono β e comparado com o aduto com 2-mercaptoetanol, indicando que a reação se dá pela adição conjugada no sistema α,β-insaturado dos nitroestirenos. O derivado fluorescente **4**, ilustrado abaixo, foi preparado e está sendo avaliado como agente fluorescente para a marcação de tiol-proteínas.



Conclusões

Nitroestirenos são potentes inibidores irreversíveis da papaína e podem ser utilizados como reagentes para identificar a atividade de cisteína proteases, como alternativa a compostos utilizados classicamente para este intuito como organomercuriais, N-etilmaleimida ou derivados do ácido iodoacético.

Agradecimentos

UFABC, CNPq, FAPESP.

¹ Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A. *Nucleic Acids Res* **2010**, 38, D227.

² Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, Ö. D.; James, K. E. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4639.

³ (a) McKerrow, J. H.; James, M. N. G. *Perspec. Drug Discov. Des.* **1996**, 6, 1. (b) Otto, H. -H.; Schirmeister, T. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 133.

⁴ Furniss, B. S. et al. In *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed.; **1989**, p. 135.

⁵ Tian, W. -X.; Tsou, C. -L. *Biochemistry* **1982**, 21, 1028.