

ALCALÓIDES β -CARBOLÍNICOS: INTERAÇÃO COM BSA, DNA (*Calf thymus*), CORRELAÇÃO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA E DOCKING MOLECULAR.

Karly T. de O. Pereira^{1*}, Marina de M. Silva¹; Camila da S. Nunes¹; Maria H. Sarragiotto², Valeria A. Barbosa², Josué C. C. Santos³, Isis M. Figueiredo³.

1. Estudante de pós-Graduação da UFAL
2. Pesquisadora do Departamento de Química da UEM
3. Pesquisador do IQB/UFAL, Coorientador e Orientadora

Resumo:

Os alcaloides derivados das β -carbolinas tem despertado o interesse dos químicos sintéticos devido a potencial atividade antiproliferativa. Portanto, o estudo da interação com o DNA (principal alvo de diversos fármacos) e a proteína BSA (albumina de soro bovino, proteína carreadora de vários medicamentos) torna-se importante para projeção de novos fármacos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a interação de β -carbolinas com o ctDNA (*Calf thymus*) e a BSA, por meio das técnicas espectroscópicas. Os resultados mostraram que os compostos avaliados interagem com o ctDNA via intercalação, com valores das constantes de ligação, K_b , variando na faixa de $2,45 \times 10^4$ a $1,18 \times 10^6$ L mol⁻¹ e, que esse modo de ligação para alguns compostos pode ser o principal mecanismo de ação antiproliferativa dos mesmos. Foi também observado boa afinidade com a BSA, estudo teórico mostraram que o composto 9e apresenta uma afinidade de ligação de -14.3 kcal mol⁻¹ no subdomínio IIA (sítio I) da albumina e os valores de K_b para os compostos variaram de $3,2 \times 10^4$ a $4,1 \times 10^6$ L mol⁻¹, sugerindo assim que estes podem ser armazenados e transportados através corpo pela proteína até chegar em seu alvo farmacológico.

Palavras-chave: β -carbolinas; ctDNA; albumina; técnicas espectroscópicas; *docking* molecular.

Apoio financeiro: FAPEAL, CAPES e CNPq

Introdução:

O estudo de interações macromolécula-ligante é baseado na teoria da química supramolecular, a qual estuda formações de complexos moleculares por meio de ligações não covalentes, como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, entre outras (VARSHEY et al., 2012).

Estas interações podem ocorrer entre diversas biomoléculas e pequenas moléculas, incluindo DNA-fármaco e proteína-fármaco. O estudo da formação destes dois complexos tem se expandido nos últimos anos, devido a sua grande importância no desenvolvimento de medicamentos, uma vez que o DNA é o principal alvo farmacológico de diversas doenças e, que proteínas carreadoras interferem na eficiência do fármaco. Portanto, compreender como pequenas moléculas interagem com o DNA e proteínas transportadoras, como, por exemplo, as albuminas de soro, ajuda no desenvolvimento de drogas mais eficazes e menos tóxicas ao organismo (LI et al., 2016b; RAHMAN, et al., 2017). Nesse sentido, diversas classes de compostos químicos têm sido alvo destes estudos por apresentarem uma gama de atividades biológicas, incluindo atividade antiproliferativas, como, por exemplo, derivados β -carbolínicos (SILVA et al., 2016). As técnicas instrumentais mais utilizadas para este fim são, portanto, espectroscopia de fluorescência molecular e absorção no UV-vis (DESPAIGNE et al., 2014).

Dessa forma, estudos quantitativos focados nas interações DNA-ligante e proteína-ligante, ajudam a compreender o mecanismo de ação do fármaco em nível molecular e, dessa forma, tem sido uma ferramenta importante para o sistema de *design* de compostos mais potentes e mais seletivos, sendo assim mais promissores para o uso clínico.

Assim sendo, o presente trabalho buscou avaliar, de modo quantitativo, a interação de quatro compostos bioativos derivados de alcaloides β -carbolínicos, com DNA (*Calf thymus*, ctDNA) e a proteína albumina de soro bovino (BSA), sendo o estudo deste último escasso na literatura para esta classe de compostos. Os β -carbolinas foram sintetizados pelo grupo de pesquisa da Prof^a Maria Helena Sarragiotto, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (BARBOSA et al., 2016) e o estudo foi realizado por espectroscopia UV-visível e fluorescência molecular.

Metodologia:

Os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza. Foi utilizada solução tampão Tris-HCl (50 mM, pH = 7,4) com 100 mM de NaCl para ajuste da força iônica. Os compostos foram preparados em DMSO (USA, Sigma Aldrich) e, para análise fez-se a diluição em solução tampão. O estoque do DNA *Calf thymus* (ctDNA, USA, Sigma Aldrich) e da proteína albumina de soro bovino (BSA) foram feitos em solução tampão e, para avaliar se o ctDNA estava livre de proteína, mediu-se a absorvância (em espectrofotômetro Micronal de feixe duplo modelo

AJX-6100PC) em 260 e 280 nm, onde a razão $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$, indica que a macromolécula está sem contaminação.

Posteriormente, os cálculos das concentrações das macromoléculas foram feitos através equação de *Lambert-Beer*, utilizando o valor da absorvância em 260 nm, com coeficiente de extinção molar de 6600 L mol^{-1} para o ctDNA e, o valor da absorvância em 280 nm com coeficiente de extinção molar de 44500 L mol^{-1} para a BSA.

Para os estudos da interação do ctDNA-ligante através da titulação fluorimétrica (espectrofluorímetro Shimadzu, modelo RF 5301), a concentração do composto foi mantida constante e o ctDNA foi adicionando em quantidades crescentes. Já nos ensaios de avaliação do modo de ligação com o ctDNA, foi empregado solução de iodeto de potássio, e uma solução de brometo de etídio com parâmetros instrumentais $\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 598 \text{ nm}$.

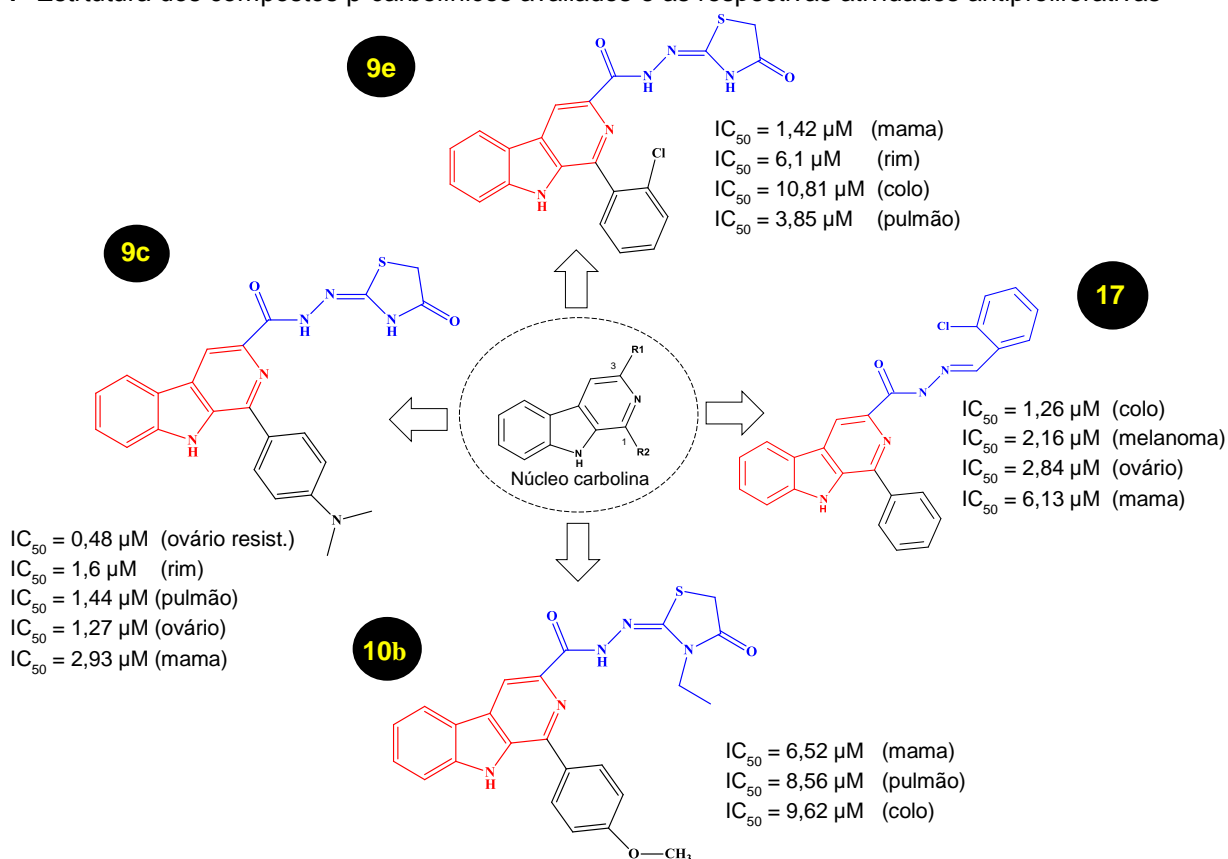
O estudo da interação BSA-ligante foi realizado por meio de titulações espectrofluorimétricas com base no monitoramento do sinal de emissão da proteína (280 nm), onde mante-se constante a concentração da macromolécula e variou, progressivamente, a quantidade dos compostos.

Foi também realizado o *docking* molecular, onde a estrutura cristalizada de BSA (PDB ID: 4F5S) foi extraída do *Protein Data Bank* (PDB). As geometrias dos compostos foram estruturadas com a ajuda do Chem3D Ultra 8.0 e as interações de ligação entre os compostos e BSA foram simuladas pelo método de *docking* molecular através do *software* AutoDock 4.2.

Resultados e Discussão:

Na Figura 1 encontram-se as estruturas dos compostos avaliados. De forma geral, quando um ligante interage com o DNA formando um complexo, mudanças nos valores de absorvância e na posição da banda podem ocorrer por UV-vis, bem como também nas intensidades de emissão por fluorescência (JAMOUT; GARGALLO, 2012; SUN, et al, 2011). Com base nessa teoria foram observados nos estudos por fluorescência molecular, que os compostos avaliados apresentaram redução na intensidade de emissão ao adicionar quantidades crescentes de DNA, confirmando, portanto, a interação. O mecanismo de *quencher* (supressão de fluorescência) pode ser expresso através da constante Stern-Volmer (K_{sv}) com variação de $3,92$ a $8,31 \times 10^4$, e a força da interação a partir da constante de ligação (K_b) (ZHAO, et al., 2014), que por sua vez variou de $2,45$ a $118,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, sendo o maior valor referente ao composto **9c**, o qual se mostrou mais ativo frente às células cancerígenas. O mecanismo de *quenching* foi estático, uma vez que o espectro de absorção da diferença entre o complexo DNA-ligante e o DNA livre não foi sobreponível ao espectro do composto livre, sendo assim a variação de absorvância diferente de zero.

Figura 1- Estrutura dos compostos β -carbólicos avaliados e as respectivas atividades antiproliferativas



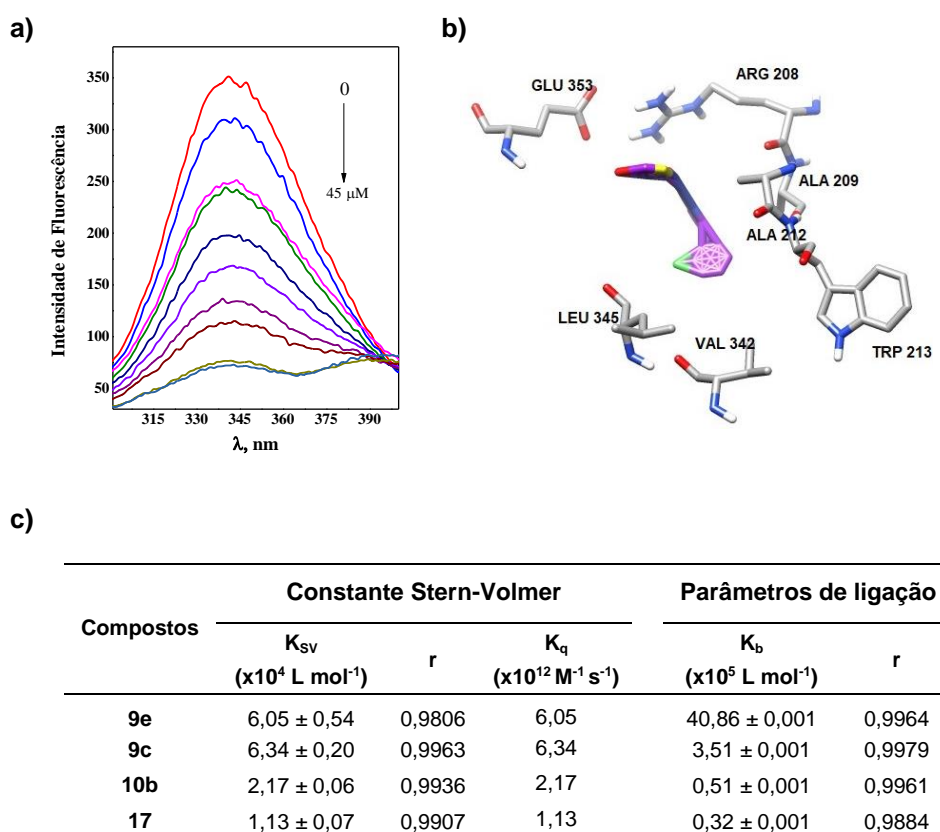
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Já o modo de ligação entre os derivados β -carbolínicos com ctDNA foi estudado avaliando o efeito de *quenching* do KI e a competição com brometo de etídio (BE) (REHMAN, et al., 2015; SARWAR, et al., 2015), sendo este último um bom intercalante ao DNA (SAVARIZ, et al., 2014). No estudo com KI pode-se observar que os valores de K_{sv} reduziram na presença de ctDNA indicando interação por intercalação. Dessa forma, o ligante fica protegido pelo DNA e, assim, não acessível aos íons iodeto. Para confirmação dos dados obtidos, o ensaio com o brometo de etídeo (BE) mostrou que a intensidade de emissão do complexo BE-DNA diminuiu à medida que a concentração dos compostos aumentou, apresentando, portanto, um percentual de decréscimo variando na faixa de 64,3 a 78,8%. Essa magnitude de decréscimo está relacionada à capacidade do composto em deslocar o BE do DNA (SILVA, et al., 2016), assim a ordem estabelece: **10b > 9e > 9c > 17a**.

Adicionalmente, foi realizado a análise de correlação, a qual mostrou que para a linhagem de cólon (HT-29) houve uma tendência linear inversa para os compostos 9e, 10b e 9c, enquanto que para a linhagem de rim (786-0), verificou-se uma tendência exponencial inversa para os compostos 9e, 17 e 9c, indicando assim que a principal via de ação do composto pode estar relacionada à interação com o DNA. Para as demais linhagens não foi possível estabelecer a correlação e estes dados estão de acordo com trabalhos encontrados na literatura SILVA et al., 2017; DAS et al., 2018).

Por fim, foi também observado, por fluorescência molecular, a interação dos compostos β -carbolínicos com a proteína BSA, quando a adição de concentrações crescentes do ligante ao sistema contendo BSA ocasionou redução do sinal analítico da proteína, caracterizando assim o efeito de *quenching* (Figura 2a). Esta interação, portanto, resultou em alterações no microambiente do subdomínio hidrofóbico IIA presente na BSA, onde está localizado o resíduo de triptofano Trp-213 (JANNESARI et al 2013; LI; YANG, 2015), o que foi confirmado através do *docking* molecular, o qual mostrou que o composto 9e apresenta uma afinidade de ligação de $-14.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ no subdomínio IIA (sítio I) da albumina. O ligante em estudo mostrou interagir por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com aminoácidos como: Trp213, Ala212, Arg208, Glu353, entre outros. Vale ressaltar que o espectro da Figura 2a e 2b referem-se ao composto 9e, pois este apresentou maior interação. Foi possível elucidar o mecanismo de *quenching* através da constante de velocidade de extinção, K_q , a qual apresentou valores $> 2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, indicando assim a forma estática. Logo, a formação do complexo supramolecular BSA-ligante ocorreu no estado fundamental. Por outro lado, os valores de K_b variaram de $3,2 \times 10^4$ a $4,1 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, (Figura 2c), o que mostra uma boa afinidade entre as moléculas e, segundo Topalá e colaboradores (2014), estes valores de K_b tornam possível o transporte do ligante através da proteína carreadora, assim como a liberação em seu alvo farmacológico.

Figura 2 – Avaliação da interação BSA-ligante. **a)** Espectro da proteína com adições crescentes de ligante 9e; **b)** Resultado do *docking* molecular para o composto 9e. **c)** Parâmetros de interação das β -carbolinas com a proteína BSA.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Dessa forma, é possível dizer que os compostos β -carbolínicos avaliados formam um complexo não

fluorescente, no estado fundamental, com o ctDNA e com a proteína BSA. Estes resultados estão de acordo com trabalhos relatados da literatura (NAFISI et al., 2012; SILVA et al., 2016; BUDDANAVA et al., 2017).

Conclusões:

Em conclusão, foi possível observar a formação dos complexos supramoleculares ctDNA-ligante e BSA-ligante, por meio do mecanismo de *quenching* estático. As interações com o ctDNA variou na faixa de $2,45 \times 10^4$ a $1,18 \times 10^6$ L mol⁻¹, sendo que esta interação ocorre preferencialmente via intercalação. Foi também estabelecida uma correlação entre os valores de K_b vs IG_{50} para as linhagens linhagem de cólon (HT-29) (compostos 9e, 10b e 9c) e para a linhagem de rim (786-0) (9e, 17 e 9c), indicando assim que a principal via de ação do composto, para estas linhagens, pode estar relacionada à interação com o DNA.

Por outro lado, os compostos avaliados interagiram com a BSA apresentando valores de K_b na faixa de $3,2 \times 10^4$ a $4,1 \times 10^6$ L mol⁻¹ e por meio de docking molecular foi possível mostrar que o composto 9e apresenta uma afinidade de ligação de -14.3 kcal mol⁻¹ no subdomínio IIA (sítio I) da albumina. Estes resultados demonstram que a proteína carreadora pode transportar os compostos até seu alvo onde será efetuado a ação farmacológica.

Referências bibliográficas

- BARBOSA, V. A., et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 124, p. 1093-1104, 2016.
- BUDDANAVAR, A. T. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 7, p. 148–155, 2017.
- DAS, S. et al. *Journal of Advanced Research*. 9, p. 51–61, 2018.
- DESPAIGNE, A. A. R. et al. *Molecules*. 19, p. 17202-17220, 2014.
- JANNESARI, Z. et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 577-590, 2013.
- JAUMOT, J.; GARGALLO, R. *Current Pharmaceutical Design*. 18, p. 1900-1916, 2012.
- SUN, H., et al. *Biochimie*. 93, p. 1351-1356, 2011.
- LI, X.; YANG, Z. *Chemico-Biological Interactions*, 232, 77–84, 2015.
- LI et al. *Food Chemistry*. 211, p. 198–205, 2016.
- NAFISI, S.; PANAHYAB, A.; SADEGHI, G. B. *Journal of Luminescence*. 132, p. 2361–2366, 2012.
- RAHMAN, Y. et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 626, p. 1-12, 2017.
- REHMAN, S. U. et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 576, p. 49–60, 2015.
- SARWAR, T., et al. *International Journal of Biological Macromolecules*. 73, p.9–16, 2015.
- SAVARIZ, F.C., et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 22, p.6867–6875, 2014.
- SILVA, M. M. et al. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 27, p. 1558-1568, 2016.
- SILVA, C. M., et al. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 172, p. 129-138, 2017.
- TOPOLÁ, T. et al. *Clujul Medica*, 87, 215–219, 2014.
- VARSHEY, D.B. et al. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. 1 ed., 2012.
- ZHAO, T. et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132, 198–204, 2014.