

DA PLANTA AO MEDICAMENTO: CASO DE ESTUDO DAS PROTEINASES DE CARICACEAE COM ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

Miriam T. P. Lopes
Abraham V. Schnaiderman
Elsa Uribe
Carlos E. Salas

10.1 INTRODUÇÃO

Estrutura e propriedades bioquímicas das proteinases vegetais. Função das proteinases em plantas

As proteinases das plantas são responsáveis pelo metabolismo proteico constituído por um conjunto de reações enzimáticas essenciais à vida. Proteinase, peptidase, protease ou enzima proteolítica são os vários nomes atribuídos às enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. Dentre essas, as

exoproteínas atuam nos extremos das proteínas-substrato, liberando o aminoácido N-terminal (aminopeptidase) ou carboxiterminal (carboxipeptidase), e as endoproteínas hidrolisam ligações peptídicas no interior da proteína. A classificação das endoproteínas se baseia no tipo de resíduo enzimático que participa da reação. Assim, foram descritas as serino proteínases, que possuem um resíduo serino no sítio ativo, cisteíno, aspartato e glutamato-proteínases, cada grupo contendo o resíduo aminoácido característico. Ainda, um grupo dessas enzimas requer um metal para exercer a catálise (metaloproteínases). Nas serino e cisteíno-proteínases, o nucleófilo que participa na reação de hidrólise é o próprio aminoácido, ao passo que uma molécula de água é o nucleófilo durante as reações com aspartato, glutamato e as metaloproteínases, sugerindo uma origem evolutiva diferente para esses grupos. Existe, ainda, um número crescente de proteínases cuja classificação em algum desses grupos é inadequada, o que indica a necessidade de uma reformulação dos critérios utilizados até agora.

O sistema elaborado por Rawlings e Barrett¹ utilizando critérios evolutivos e estruturais para classificar as proteínases em famílias e clãs (classes) representa uma alternativa de ordenamento. A base de dados MEROPS* registra cada proteínase com base nesses parâmetros e se encontra disponível na internet. O sistema MEROPS inclui, além das cinco categorias mencionadas, as categorias asparagino, treonino, mistas e proteínases desconhecidas. Em outubro de 2013, a versão 9.9 da base de dados continha 413.834 seqüências composta de 245 famílias e 61 clãs e fornece informação estrutural através de *links* para 707 estruturas (Protein Data Bank – PDB)**.

Os dados gerais da versão publicada em 11 de outubro de 2013 pelo site MEROPS se encontram na Tabela 10.1, incluindo dez categorias de proteínases, o número de seqüências para cada grupo, o identificador, quando disponível, para cada grupo e as seqüências com estrutura determinada (PDB).

Tabela 10.1 Classificação geral das proteínases de acordo com a base de dados MEROPS***

| NÚMERO DE REGISTROS PARA AS VÁRIAS CLASSES CATALÍTICAS | | | | |
|--------------------------------------------------------|------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| TIPO CATALÍTICO | SEQÜÊNCIAS | IDENTIFICADORES | IDENTIFICADORES COM NÚMERO EC | IDENTIFICADORES COM ENTRADA PDB |
| Aspártico | 18.576 | 311 | 32 | 52 |
| Cisteína | 90.153 | 934 | 73 | 153 |

* Ver <http://merops.sanger.ac.uk/>.

** Disponíveis através de <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.

*** Ver MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/statistics_index?type=P).

| NÚMERO DE REGISTROS PARA AS VÁRIAS CLASSES CATALÍTICAS | | | | |
|--------------------------------------------------------|------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| TIPO CATALÍTICO | SEQUÊNCIAS | IDENTIFICADORES | IDENTIFICADORES COM NÚMERO EC | IDENTIFICADORES COM ENTRADA PDB |
| Glutâmico | 383 | 7 | 2 | 3 |
| Metalo | 141.384 | 1.044 | 129 | 194 |
| Asparagina | 3.996 | 24 | 1 | 19 |
| Misto | 679 | 5 | 0 | 3 |
| Serina | 136.164 | 1.703 | 113 | 251 |
| Treonina | 14.958 | 99 | 4 | 29 |
| Desconhecido | 7.537 | 17 | 0 | 3 |
| Não classificados | 4 | 3 | 24 | - |
| Total | 413.834 | 4.147 | 378 | 707 |
| Total de Famílias | | | | 245 |
| Total de clãs | | | | 61 |

As serino e metalo-proteinases representam 32% a 34% das anotações, seguidas pelas cisteíno-proteinases (21%), aspartato-proteinases (4%) e menores proporções dos outros grupos. A importância das enzimas proteolíticas não desmerece a relevância dos inibidores naturais, muitos dos quais são, também, proteínas que interagem com proteinases-alvos, modulando a atividade destas últimas^{2,3}.

Neste capítulo são abordadas as proteinases de plantas, do ponto de vista funcional, e, em uma segunda parte, as possíveis atividades farmacológicas dessas macromoléculas, mais especificamente a atividade cicatrizante de cisteíno-proteases do látex de *Vasconcellea cundinamarzensis*.

10.2 PLANTAS LACTÍFERAS E ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

As plantas lactíferas (> 20.000) possuem uma rede de condutos distribuídos nos diversos órgãos através dos quais circula o látex. O látex é uma suspensão que contém vários tipos de moléculas, terpenos, alcaloides, borrachas, cardenolidos e vários tipos de proteínas⁴. Embora se atribua ao látex uma função essencialmente protetora, este também poderia servir de veículo de excreção de metabólitos. Além das moléculas menores encontradas no látex (metabólitos secundários), que exibem atividade tóxica contra animais e insetos, encontramos também proteínas, algumas das quais possuem reconhecida atividade enzimática.

Em *Hevea brasiliensis*, árvore produtora da borracha, existe a heveína, uma proteína de menor tamanho (4,7 KDa) semelhante a uma aglutinina encontrada em *Urtica dioica*, que é capaz de se aglutinar com quitina, sugerindo ação antifúngica e inseticida⁵. Ainda no látex de *H. brasiliensis* se encontram enzimas capazes de produzir terpenos, moléculas^{1,4} polisopreno precursores da borracha^{6,7}. É possível que a borracha também aja como defensivo através das propriedades aderentes que imobilizam o predador.

Outro grupo de lactíferas possui enzimas proteolíticas, e nesse caso as enzimas são excretadas após injúria da planta. Ao menos quatro grupos de proteinases foram descritas nessas lactíferas: cisteíno, serino, metalo e aspartato-proteinases. Uma revisão atualizada das enzimas identificadas no látex de *Vasconcellea cundinamarzensis*⁸ mostra que cisteíno-proteinases, junto às serino proteinases, compõem o grupo majoritário nessas plantas. Nas *Vasconcelleas*, a hidrólise proteica faz parte do processo intra e extracelular e inclui a degradação de proteínas de reserva durante a germinação da semente, maturação de frutos, ativação de proenzimas, degradação de enzimas defeituosas ou que cumpriram sua função metabólica para disponibilizar novamente aminoácidos para a síntese de novas proteínas⁹. As enzimas proteolíticas participam do desenvolvimento, morfogênese, biogênese celular, senescência celular e na morte celular programada, de maneira semelhante ao que sucede em animais. A ação proteolítica também inclui os processos de sinalização e respostas ao estresse biótico e abiótico, gerando uma resposta defensiva^{3,10,11}.

Em Caricaceae a resposta defensiva se inicia com a liberação de látex no sítio da injúria, que por um intervalo relativamente curto (dois a cinco minutos) escorre pela ferida, produzindo um coágulo, que atua como barreira protetora no local da lesão, impedindo a perda progressiva do látex. No transcurso de três a sete dias é possível comprovar a formação de uma crosta no lugar da lesão. A Figura 10.1A ilustra a evolução desse processo em um intervalo de 20 dias. Observa-se que o sistema de cicatrização em Caricaceae emula o que ocorre em mamíferos (Figura 10.1A-C). Entretanto, no fruto da planta, por representar o estágio final na transformação do órgão, o processo regenerativo não se completa de maneira semelhante ao que ocorre em mamíferos; pelo contrário, observa-se no fruto lesado, quando coletado antes do amadurecimento (Figura 10.1B), que há um atraso da maturação (área mais verde) ao redor da lesão. Isso se explica conforme o descrito por Azarkan et al.¹², que demonstraram um aumento na atividade de enzimas proteolíticas após injúria, de modo que resulta evidente que as enzimas proteolíticas retardam o amadurecimento do fruto. A observação

inversa é reconhecida popularmente, quando o fruto se encontra próprio para o consumo, apresenta atividade proteolítica residual. Observações não publicadas confirmam que quando os frutos pós-coleta são tratados com soluções contendo enzimas proteolíticas, podem ter sua vida útil prolongada em até 50%, sem deterioração visível.

| TOTALS FOR ALL CATALYTIC TYPES | | | | |
|--------------------------------|-----------|-------------|-----------------------------|------------------------------|
| Catalytic Type | Sequences | Identifiers | Identifiers with EC numbers | Identifiers with PDB entries |
| Aspartic | 18576 | 311 | 32 | 52 |
| Cysteine | 90153 | 934 | 73 | 153 |
| Glutamic | 383 | 7 | 2 | 3 |
| Metallo | 141384 | 1044 | 129 | 194 |
| Asparagine | 3996 | 24 | 1 | 19 |
| Mixed | 679 | 5 | 0 | 3 |
| Serine | 136164 | 1703 | 113 | 251 |
| Threonine | 14958 | 99 | 4 | 29 |
| Unknown | 7537 | 17 | 0 | 3 |
| Unclassifiable | 4 | 3 | 24 | - |
| Grand Total | 413834 | 4147 | 378 | 707 |
| Total Families | | | | 245 |
| Total clans | | | | 61 |

Figura 10.1 (A) Fruto de *Vasconcellea cundinamarcensis*, 20 dias após extração do látex; (B) fruto de *Vasconcellea cundinamarcensis*, 10 dias após extração de látex; (C) cicatrização em indivíduo após trauma físico.

10.3 CICATRIZAÇÃO EM LACTÍFERAS VERSUS MAMÍFEROS

Para melhor entender o processo de coagulação em plantas, podemos utilizar os conceitos descritos para a hemostasia, antes e durante a coagulação, em mamíferos. Primeiramente, previamente à coagulação, o sangue deve se manter em estado líquido, sem formar trombos que impeçam sua livre distribuição no sistema circulatório. O vaso sanguíneo, revestido internamente pelo endotélio, impede a ativação plaquetária (essencial à coagulação), produzindo moléculas inibitórias dessa ativação (prostaciclina, NO, trombomodulina e heparina entre outras) e, também, produzindo protease ativadora de plasmina (t-pA) para dissolver eventuais coágulos de fibrina (trombos) que possam interferir na fluidez do sangue. O equilíbrio é alterado quando ocorre a ruptura do endotélio, expondo a camada subendotelial de natureza trombogênica por possuir sítios para adesão (colágeno, miofibrila) das

plaquetas, iniciando-se, assim, a ativação plaquetária. A presença do fator tissular produzido pelos fibroblastos subendoteliais inicia a coagulação sanguínea, mediada pela ativação proteolítica (serino protease) do fator VII presente no sangue. O conjunto de reações que se sucedem, envolvendo os fatores VIIa, Xa, trombina e fator XIIIa (serino proteases, exceto o fator XIIIa), levam à formação do coágulo de fibrina. O processo iniciado pelo fator tissular é conhecido como cascata de coagulação da via extrínseca, já que existe, também, uma forma alternativa para iniciar a coagulação denominada de via intrínseca. A cascata da coagulação é um processo hierarquizado, sequencial, em que um precursor inicialmente ativado ativa o precursor seguinte da cascata gerando um efeito multiplicador, podendo uma mesma enzima participar de múltiplas reações de ativação. A Figura 10.2 apresenta uma esquematização da cascata de coagulação com as vias extrínseca e intrínseca.

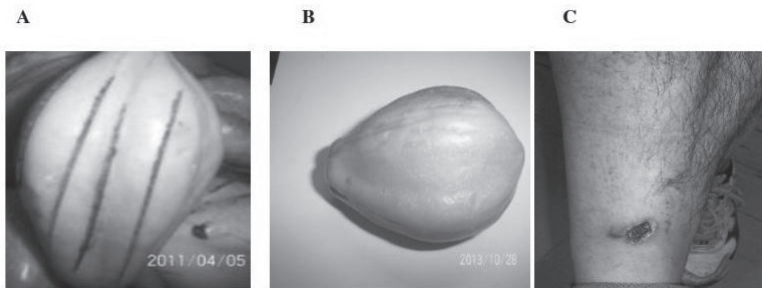


Figura 10.2 Esquema simplificado da coagulação sanguínea em mamíferos.

Nas plantas lactíferas ocorre uma situação semelhante à descrita: o látex no estado líquido deve permanecer fluido circulando pelos canais lactíferos, garantindo a distribuição de metabólitos na planta. Desconhece-se o tipo de substâncias que impedem a coagulação do látex; entretanto, várias substâncias já descritas poderiam servir como potenciais inibidores. É possível, também, que moléculas ativadoras da coagulação se encontrem isoladas do látex e que, no momento da lesão na planta, esses ativadores entrem em contato com o látex, como ocorre no sangue. Após a injúria, o látex é liberado pela área lesada, durante um período não superior a três a seis minutos. Durante

esse processo, o látex que fica aderido à área lesada é coagulado, passando do estado líquido ao sólido.

O fenômeno de gelificação/tamponamento em ductos de resinas e lactíferos já foi reconhecido há mais de 20 anos^{13,14}, mas os autores não conseguiram identificar os mecanismos que medeiam a transformação.

Em nosso modelo de Caricaceae, amostras do látex retiradas da lesão durante a coagulação evidenciam a presença de enzimas proteolíticas no fluido, cujas atividades sofrem modificação durante esse processo. Ao mesmo tempo, o perfil eletroforético de proteínas observado por SDS-PAGE também é modificado. Esses resultados são interpretados como se, durante a coagulação, várias atividades proteolíticas fossem sequencialmente ativadas para metabolizar componentes proteicos, gerando um coágulo que age como barreira protetora na área lesada, impedindo a saída de fluidos e a possível entrada de agentes patogênicos ou predadores¹⁵. A Figura 10.3 mostra as variações da atividade proteolítica durante o intervalo em que o látex é coagulado.

Em mamíferos, os eventos que sucedem a coagulação do sangue correspondem ao processo de cicatrização tecidual, fenômeno que pode ser dividido em três etapas: (a) inflamação; (b) proliferação; e (c) modelagem da matriz celular. Dependendo da gravidade da lesão, esse processo pode demorar de três semanas a dez meses, quando não existem agentes que perturbem

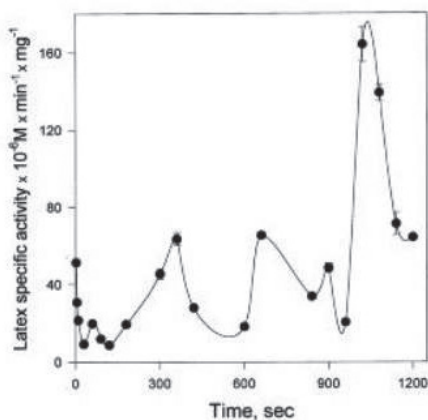


Figura 10.3 Atividade amilásica de frações colhidas durante a coagulação do látex do fruto de *Carica papaya*. Aliquotas do látex foram coletadas em vários intervalos entre 1 segundo 1.200 segundos e foram dosadas as atividades amilásicas¹⁵. A concentração proteica de cada amostra foi determinada por Bradford¹⁶. Os resultados representam médias de três amostras coletadas, independentemente, com seu desvio padrão.

a evolução normal do processo regenerativo. No modelo de cicatrização em frutos imaturos de lactíferas, a lesão do exocarpo segue um processo de cicatrização mais rápido em Caricaceae (15 a 30 dias) em função do curto intervalo de amadurecimento do fruto *in natura*. É preciso lembrar que, junto com o amadurecimento do fruto, há um notável declínio da atividade proteolítica do látex, condizente com a noção de que não há mais necessidade de proteger o fruto na condição de madureza. Essa observação abona o conceito de proteção temporária que oferecem as proteinases contra agentes predadores durante a maturação do fruto.

Contudo, existem outros antecedentes que apoiam o papel protetor do látex em Caricaceae. Azarkan et al. (2006)¹² observaram que após consecutivas agressões mecânicas do fruto houve aumento na atividade das enzimas proteolíticas secretadas no látex, sugerindo uma resposta ao estresse induzido pela lesão mecânica. Também, a presença de chitinase em látex de várias espécies, incluindo Caricaceae, sugere a ideia de proteção contra insetos e/ou fungos¹⁷, e um inibidor de serino proteinase da classe Kuniz identificado em látex de Caricaceae pode inibir a atividade proteolítica das enzimas digestivas dos insetos predadores¹⁸. Finalmente, em experimentos em que se aplicaram diretamente as proteinases do látex de Caricaceae em folhas de plantas, houve inibição da atividade predatória das larvas de *Samia ricini*, e que a atividade predatória dependia da presença das enzimas proteolíticas, já que quando eram inibidas perdeu-se a capacidade protetora¹⁰. Em resumo, a evidência apresentada sugere que os componentes do látex em Caricaceae desempenham um papel protetor na planta, já que, ao mesmo tempo que inibem a atividade predatória, interferindo no metabolismo do predador, protegem a planta, criando uma barreira protetora quando da lesão na superfície lesada.

A partir da observação do envolvimento de enzimas proteolíticas cisteínicas na regeneração do tecido vegetal de plantas da família Caricaceae foi proposto o estudo da atividade mitogênica e cicatrizante em frações ricas em proteases do látex de *V. cundinamarcensis* (anteriormente chamada de *Carica candamarcensis*). A purificação dos componentes proteolíticos, obtida por filtração cromatográfica em Sephadex G10, gerou duas frações (P1G10 e P2G10), sendo a primeira delas abundante em cisteíno-proteases¹⁹. Após duas etapas de purificação cromatográfica, em colunas CM-Sephadex e Mono S, foram isoladas duas proteases (CMS2MS2 e CMS2MS3) com atividade mitogênica em fibroblastos e outras linhagens celulares²⁰. A proliferação celular estimulada por CMS2MS2 é mediada pela via das MAP

quinases, como estabelecido pelo aumento da fosforilação de ERK-2, independentemente de sua atividade proteolítica^{20,21}.

A inédita descoberta de uma proteína mitogênica vegetal com atividade sobre células de mamíferos levou à solicitação de um registro de patente para resguardar as aplicações potenciais da descoberta²⁹.

Conforme as normas das agências regulatórias relacionadas com saúde, o desenvolvimento de um novo medicamento contempla a realização de uma série de etapas. De modo geral, após a identificação da nova molécula ou amostra e da atividade biológica (potencial farmacológico) *in vitro*, a avaliação pré-clínica deve ser realizada. Essa avaliação consiste na aplicação da nova molécula em animais de experimentação definindo os potenciais terapêutico, toxicológico e farmacocinético.

Uma vez estabelecidos esses parâmetros, a seguinte etapa é realizada em seres humanos (ensaios clínicos). Na primeira fase do estudo clínico, denominada de Fase I, são recrutados pequenos grupos de indivíduos hígidos voluntários (entre 20 a 100). Essa pesquisa tem como objetivo estabelecer uma evolução preliminar da segurança e do perfil farmacocinético e, quando possível, um perfil farmacodinâmico da substância. Na sequência, são realizados os ensaios clínicos de Fase II (estudo terapêutico piloto), que visam demonstrar a atividade e estabelecer a segurança em curto prazo do princípio ativo, em pacientes afetados por uma determinada enfermidade ou condição patológica. A pesquisa é realizada em um número, ainda, limitado (entre 100 e 200) de indivíduos e estabelece as relações dose-resposta a fim de obter sólidos antecedentes para a elaboração de estudos terapêuticos ampliados (Fase III).

A fase seguinte (III) consiste em estudos internacionais, de larga escala, em múltiplos centros, com diferentes populações de pacientes para demonstrar eficácia e segurança (população mínima de 800 indivíduos). Exploram-se, nessa fase, o tipo e perfil das reações adversas mais frequentes, assim como características especiais do medicamento e/ou especialidade medicinal, por exemplo: indicação terapêutica, dose e via de administração, interações clinicamente relevantes, principais fatores que possam modificar o efeito, tais como idade, sexo etc.

Nesse momento, o medicamento pode ser comercializado. No entanto, o ensaio clínico é continuado após a comercialização, o que é denominado de Fase IV. Essa fase é também chamada de estudos de farmacovigilância, quando se estabelece o valor terapêutico, o surgimento de novas reações adversas e/ou confirmação da frequência de surgimento das já conhecidas,

e as estratégias de tratamento. Nas pesquisas de Fase IV são seguidas as mesmas normas éticas e científicas aplicadas às pesquisas de fases anteriores.

Com a ideia de desenvolver um medicamento a partir da constatação da atividade mitogênica de proteases do látex de *V. cundinamarcensis*, idealizamos uma sequência de avaliações para os estudos farmacológicos pré-clínicos compreendendo a atividade cicatrizante sobre lesões de pele de origens diversas, assim como a atividade cicatrizante gástrica, sempre utilizando concentrações/doses crescentes do princípio ativo.

A fração P1G10 (0,1%) incorporada em creme Polawax® apresentou efeito cicatrizante sobre escoriações promovidas em camundongos Hairless, com aumento da taxa de cicatrização em até 500% em comparação aos animais controles, sendo também mais eficaz que a própria papaína, a qual promoveu um aumento de 66% na taxa de cicatrização²². A atividade cicatrizante da fração (0,05%), também é evidente em lesões de excisão de pele. Nesse modelo, a oclusão da ferida é acelerada 1,7 vez em comparação com o controle, após cinco dias de tratamento. O aumento da cicatrização é acompanhada de aumento transiente do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor* – VEGF) na região afetada, além de uma melhor resolução de parâmetros inflamatórios (dados não publicados). Em ensaios complementares, a neoformação vascular (angiogênese) induzida pelo princípio foi avaliada através de implantes de polietileno na região subcutânea dorsal de camundongos Swiss que receberam soluções de P1G10 durante oito dias. O conteúdo de hemoglobina presente nos implantes contendo 0,1% P1G10 aumentou 57% em relação ao controle²³.

Em modelo de queimadura, P1G10 (0,1%) incorporada em Polawax®, em camundongos Hairless submetidos à escaldadura da pele, mostrou aumento na velocidade de cicatrização das queimaduras, com período de retração da lesão significativamente menor quando comparado ao controle. A análise microscópica mostrou que o infiltrado inflamatório foi menor, ou até mesmo ausente, nos animais tratados²⁴. Ainda sobre a atividade cicatrizante de P1G10 em lesões cutâneas, em lesões induzidas pela proteína necrótica do veneno de *Loxosceles* (aranha-marrom), vimos que o fechamento da lesão é acelerado quando o P1G10 (0,4%) é administrado localmente (dados do nosso laboratório).

A partir dos relevantes resultados obtidos sobre a cicatrização cutânea, a fração P1G10 foi submetida à avaliação da atividade cicatrizante gástrica em úlceras provocadas pela injeção de ácido acético, que são definidas como úlceras crônicas. A administração oral de P1G10, na dose de 10 mg/Kg, estimulou a cicatrização das lesões de maneira similar ao grupo tratado com

omeprazol 10 mg/Kg (63%) e superior ao apresentado pela ranitidina 100 mg/Kg (52%)²³. Diante desse resultado, passamos à investigação do modo de ação da fração e verificamos que esta é capaz de aumentar em quatro vezes a proliferação celular no bordo das lesões em comparação ao grupo controle. A atividade proteolítica da fração se mostrou importante para o seu efeito cicatrizante, mas não para o efeito mitogênico (dados do nosso laboratório).

Pelo que se pode entender, não só o processo de cicatrização foi estimulado pela fração, mas também a manutenção do equilíbrio de produção ou liberação de agentes endógenos protetores e agressores da mucosa gástrica. Em modelos de lesões agudas, verificamos que o tratamento oral com a fração na dose de 10 mg/Kg protege o estômago de lesões promovidas por etanol, indometacina, estresse e ligação pilórica, reduzindo entre 40% e 88% o número e a gravidade de tais lesões. Nessa mesma dose, verificou-se que a fração reduz a quantidade de ácido e pepsina presentes no suco gástrico e aumenta os níveis de muco e grupos sulfidrilas na mucosa, o que pode explicar sua ação gastroprotetora²³.

10.4 PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS

Em estudos de toxicidade tópica, verificou-se que a exposição repetida à fração proteica P1G10 (0,1 e 1,0%), por 15 dias, em pele íntegra e escarificada de camundongos Hairless não promoveu qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como efeito tóxico (irritação e/ou corrosão). Já a concentração de 10% apresentou um potencial irritante moderado; no entanto, essa irritação foi revertida após cinco dias da última aplicação²².

Na avaliação da toxicidade tópica subcrônica/crônica, a fração foi administrada durante três e seis meses, na concentração de 0,1% (maior efeito cicatrizante) em camundongos Swiss, previamente depilados. Os resultados da análise histopatológica e da variação de peso dos órgãos selecionados mostraram que não houve diferenças entre o grupo controle (Polawax®) e o tratado com P1G10, indicando uma ausência de toxicidade no modelo estudado²⁴.

A toxicidade sistêmica aguda de P1G10 foi avaliada, determinando-se as doses não letais da fração como sendo abaixo de 5 mg/Kg para as vias intraperitoneais (*i.p.*) e intravenosa (*i.v.*) e abaixo de 300 mg/Kg para administração oral (*v.o.*). Esses resultados demonstram a baixa toxicidade de P1G10 por via sistêmica, permitindo a execução de estudos pré-clínicos e clínicos com segurança. Corroborando esses resultados, as atividades de enzimas do

citocromo P450, o consumo alimentar, o ganho de peso corporal, o peso do fígado e os valores de proteínas totais microsossomais não foram alterados pela administração oral de P1G10, em doses até 30 vezes maiores (334 mg/Kg/dia durante 6 dias consecutivos, totalizando, nesse período, 2 g/Kg por *v.o.*) que a descrita com atividade antiúlcera gástrica (10 mg/Kg)²⁵.

A avaliação da atividade genotóxica foi realizada pelo teste de Ames²⁶ e dos micronúcleos²⁷. O primeiro foi realizado com um painel de cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 97, 98, 100 e 102), na presença e ausência de extrato S9 (extrato hepático de ratos tratados com fenobarbital). Os resultados mostraram que P1G10 não apresenta efeito mutagênico nas concentrações estudadas, uma vez que o número de colônias que sofreram reversão pelo tratamento com a fração nas concentrações de 0,1 e 1,0% p/v foi semelhante ao número de reversões espontâneas (controle negativo) e 10 vezes menores que o obtido após a exposição à azida sódica (controle positivo). No teste de Micronúcleos, P1G10 foi administrada via *i.p.* em camundongos Swiss, nas doses de 5 e 10 mg/Kg. A avaliação de células de medula óssea desses animais, após 36 horas da administração, mostrou que P1G10 não provocou micronucleação significativamente maior que o controle, sugerindo a ausência de genotoxicidade da fração²⁸.

10.5 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

Utilizando P1G10 marcada com o isótopo radioativo ^{99m}Tc em camundongos Swiss pudemos observar que, por *e.v.*, as maiores taxas relativas (área sob a curva, do inglês *area under the curve* – AUC, $AUC_{\text{órgão}} / AUC_{\text{sangue}} = Kp$) foram encontradas na bexiga (113,7), rins (46,1), intestino grosso (5,5), fígado (4,2) e intestino delgado (1,2), enquanto pele (0,72), coração (0,68), tireoide (0,48), tecido adiposo (0,30) e cérebro (0,06) apresentaram as menores taxas. Em outras palavras, as maiores taxas de captação foram observadas nos órgãos relacionados à metabolização e excreção de fármacos. Já para a via *v.o.*, as maiores taxas de *Kp* foram encontradas nos órgãos do trato gastrointestinal, corroborando com o pequeno valor de biodisponibilidade por essa via (8,3%) (dados do nosso laboratório).

Em vista do potencial efeito cicatrizante cutâneo e da segurança determinadas em modelos de experimentação animal, avançamos no processo de desenvolvimento de um medicamento e iniciamos a realização de ensaios clínicos.

10.6 ESTUDO CLÍNICO DE FASE I

Dada a possível utilização da fração P1G10 como cicatrizante cutâneo, ela foi administrada na concentração de 0,1% no antebraço de voluntários hígidos por 30 dias, três vezes por semana. Dos 25 indivíduos participantes da avaliação, nenhum desenvolveu reações evidenciadas por eritema, edema, calor, dermatite, prurido ou dor no local da aplicação do veículo ou da amostra 0,1% P1G10. Exames laboratoriais (hemograma, análises bioquímicas no sangue e urina) foram realizados antes e após as aplicações do produto. Nas duas situações, obtivemos diferenças significativas de alguns valores do hemograma e dosagens séricas bioquímicas, com e sem aplicação do produto, porém, esses valores estavam compreendidos no intervalo de normalidade, ou seja, sem relevância clínica. Assim, a partir da constatação da inocuidade da fração P1G10, demos os primeiros passos na avaliação da eficácia e segurança do uso de P1G10 como cicatrizante cutâneo em humanos: a Fase Clínica II.

10.7 ENSAIO CLÍNICO FASE II

Nesta fase, um estudo piloto foi realizado na cidade de Ciego de Ávila, Cuba, cujo protocolo de ensaio clínico Fase II foi aprovado pelo Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos (CENCEC), Havana, Cuba. Esse estudo foi randomizado, controlado e duplo-cego, consistindo em tratar úlceras por pressão e venosas. A população foi composta por indivíduos adultos (de idade igual ou superior a 18 anos), de ambos os sexos, residentes na cidade de Ciego de Ávila, capital da província de Ciego de Ávila, em Cuba.

Das 210 famílias cadastradas e atendidas pelo Centro Policlínico, dez indivíduos atendiam os critérios de inclusão, de modo que a amostra foi dividida em quatro grupos, sendo dois de cada um, por alocação aleatória, de acordo com as opções de tratamento: a) aplicação de creme contendo 1,0% sulfadiazina de prata a e b) aplicação de creme contendo a fração 0,1% P1G10. Os esquemas de tratamento foram semelhantes para os quatro grupos, aplicando-se o creme três vezes por semana, até a confirmação visual da existência de tecido de granulação em 100,0% da lesão, ou sua epitelização completa, ou que completassem as seis semanas de tratamento.

Nessa fase, também não foram encontradas evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade da fração P1G10 0,1% em úlceras por pressão ou

venosas, considerando a limitação do tamanho amostral. As feridas tratadas com a fração P1G10 0,1% apresentaram, em média, diminuição dos valores de comprimento (51,0%), largura (67,0%) e profundidade (37,0%), enquanto apenas os valores de profundidade das feridas tratadas com 1,0% sulfadiazina de prata diminuíram (74,0%) e os de comprimento e largura aumentaram; entretanto, o reduzido tamanho da amostra não permitiu elaborar conclusões a partir desses resultados.

O recrutamento de indivíduos que possam fazer parte de um ensaio clínico é tarefa difícil, como pode ser visto na literatura e no exemplo acima, considerando os critérios de inclusão/exclusão. Desse modo, no momento estamos realizando um ensaio de Fase II mostrando o efeito de P1G10 em feridas de indivíduos diabéticos, considerando que, dada a dificuldade de cicatrização dessas feridas, o produto possa ser uma indicação terapêutica.

Simultaneamente aos ensaios clínicos de Fase II, vem sendo desenvolvida a aplicação terapêutica em pessoas com lesões crônicas de difícil cicatrização. Assim, um número significativo de indivíduos se tem beneficiado com o tratamento, utilizando o sistema de receita magistral emitido por profissional da saúde. A Figura 10.4 mostra a evolução de uma lesão profunda infeccionada que, após um período de três meses de tratamento com a fração proteolítica, atingiu a epitelização completa. Deve-se ressaltar que, anteriormente, o paciente foi submetido a técnicas e tratamento preconizados para a cicatrização da lesão (limpeza, desbridamento e aplicação de antibióticos) por mais de seis meses, sem sucesso.



Figura 10.4 Estado inicial e final de úlcera submetida a tratamento com P1G10. Uma formulação de aplicação tópica contendo P1G10 foi aplicada três vezes por semana durante um período de 100 dias. O leito da ferida foi limpo com soro fisiológico antes da aplicação da formulação.

10.8 CONCLUSÃO

É possível concluir que componentes do látex da Caricaceae *V. cundinamarcensis* apresentam ação cicatrizante heteróloga, quando aplicados na pele de mamíferos. Nos modelos animais estudados, essas cisteíno-proteinases foram eficazes como cicatrizante em lesões cutâneas de diferentes etiologias. É provável que a ação cicatrizante esteja relacionada com a capacidade mitogênica, mostrada para algumas das enzimas presentes no látex. Aliado ao exposto, essas proteinases apresentam baixa toxicidade tópica em humanos, assim como possuem relevantes características terapêuticas para serem utilizadas na clínica.

REFERÊNCIAS

1. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* 1993;290(Pt 1):205-18.
2. Richardson M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry.* 1977;(16)159-69.
3. Grudkowska M, Zagdanska B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol.* 2004;51:609-24.
4. Konno K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry.* 2011;72:1510-30.
5. Parijs JV, Broekaert WF, Goldstein IJ, Peumans WJ. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta.* 1991;183:258-64.
6. Backhaus RA. Rubber formation in plants; a mini-review. *Israel Journal of Botany.* 1985;34:283-93.
7. Cornish K. The roles of cis and trans prenyl transferases in polyisoprene biosynthesis. *European Journal of Biochemistry.* 1993;218:267-71.
8. Gomes MT, Oliva ML, Lopes MT, Salas CE. Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. *Curr Protein Pept Sci.* 2011;12:417-36.
9. Wiśniewski K, Zagdańska B. Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J Exp Bot.* 2001;52:1455-63.
10. Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* 2004;37:370-8.
11. Van der Hoorn RAL, Jones JDG. The plant proteolytic machinery and its role in defense. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7:400-7.
12. Azarkan M, Dibiani R, Baulard C, Baeyens-Volant D. Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity. *Internat J of Biol Macromolecules.* 2006;38:216-24.
13. Dussourd DE, Denno RF. Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. *Ecology.* 1991;72:1383-96.
14. Dussourd DE. Behavioral sabotage of plant defense: Do vein cuts and trenches reduce insect exposure to exudate? *Journal of Insect Behavior.* 1999;12:501-15.
15. Moutim V, Silva LG, Lopes MTP, Wilson Fernandes G, Salas CE. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Sci.* 1999;142:115-21.
16. Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

17. Graham LS, Sticklen MB. Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany*. 1994;72: 1057-83.
18. El Moussaoui A, Nijs M, Paul C, Wintjens R, Vincentelli J, Azarkan M, Looze Y. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:556-70.
19. Silva CA, Gomes MTR, Lopes MTP, Mello VJ, Ferreira RS, Rodrigues KCL, Salas CE. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Planta Medica (Stuttgart)*. 2003;69:926-32.
20. Gomes MTR, Mello VJ, Rodrigues KCL, Bemquerer M, Lopes MTP, Faça VM, Salas CE. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. *Planta Medica (Stuttgart)*. 2005;71:244-8.
21. Gomes MTR, Teixeira RD, Ribeiro H, Turchetti AP, Junqueira C, Lopes MTP, Nagem RAP, Salas CE. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of CMS1MS2. *Acta Crystallographica Series F*. 2008;1:1-5.
22. Mello VJ, Gomes MTR, Lopes MTP, Rodrigues KCL, Sanchez EF, Salas CE. Plant proteinases: Their potential as therapeutic drugs In: *Recent progress in medicinal Plants: Development from new molecules* ed. Houston: Studium Press LLC; 2005. v.11, p. 213-224.
23. Mello VJ, Gomes MTR, Lemos FO, Delfino JL, Andrade SP, Lopes MTP, Salas CE. Plant proteinases: the gastric protective and healing role of cysteine proteinases from Caricaceae. *Phytomedicine (Stuttgart)*. 2008;15:237-44.
24. Lemos FO, Ferreira LA, Cardoso VN, Cassali G, Salas CE, Lopes MTP. Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. *European Journal of Dermatology*. 2011;21:722-30
25. Salas CE, Villalba MI, Mello V, Bilheiro R, Cassali G, Tagliati C, Martínez-Larrañaga M, Anadon A, Lopes MTP. Oral subchronic toxicity evaluation of a latex proteolytic fraction from *Carica candamarcensis*. *Toxicol Lett*. 2010;196:S258.
26. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983;113:173-215.
27. Fenech M. Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res*. 1985;148:29-36.
28. Villalba M, Silva AC, Tagliati C, Cassali G, Salas CE, Lopes MTP. Acute systemic toxicological and mutagenic evaluations of a proteolytic fraction from latex of *Carica candamarcensis*. *Toxicol Lett*. 2010;196:S167.
29. Salas C, Lopes M, Schidermann A, inventors. Proteases from *Carica* having mitogenic activity and their methods of use. United States patent. US20060153830A1; 2006 Mar 17.

