

Caracterização Bioquímica e Farmacológica de Proteases do Látex de *Carica candamarcensis* com Atividade Mitogênica

Marco Túlio R. Gomes

O látex de Caricaceae é uma fonte tradicional de enzimas proteolíticas as quais são amplamente utilizadas na indústria e como preparações farmacológicas. Relatos etnofarmacológicos indicam que *Carica candamarcensis*, membro da família Caricaceae e comum a algumas áreas na América do Sul, é usada no tratamento de disfunções gástricas. É creditado às cisteíno proteases de Caricaceae funções defensivas na planta. Após injúria no epicarpo do fruto, essas enzimas iniciam um processo de coagulação semelhante ao que ocorre em mamíferos. Uma fração contendo proteases de *C. candamarcensis* estimulou a proliferação de células de mamíferos, sugerindo um papel na regeneração do tecido lesado. Também existem evidências que algumas enzimas auxiliam na cicatrização de úlceras gástricas e abrasões cutâneas realizadas em modelos murinos. Neste trabalho, nosso primeiro objetivo foi isolar e caracterizar proteases com atividade mitogênica presentes no látex de *C. candamarcensis*. Em seguida, visamos determinar a estrutura primária e terciária de uma dessas enzimas assim como analisar possíveis mecanismos de ação dessa substância. Após três processos cromatográficos foram isoladas duas cisteíno proteases (CMS2MS2 e CMS2MS3) com aproximadamente 23 kDa. CMS2MS2 estimulou a proliferação celular acima de 50% quando comparado ao controle em fibroblastos, osteoblastos e insulinooma. O efeito mitogênico foi observado com aproximadamente 1 nM de enzima e foi independente da atividade proteolítica quando avaliado em fibroblasto. Além disso, o inibidor específico de MEK (PD98059), que bloqueia a via das MAP-quinases, aboliu a atividade mitogênica de CMS2MS2. O efeito inibitório desse composto também foi observado quando CMS2MS2 esteve inibido por E-64. Entretanto, a proliferação celular foi apenas moderadamente diminuída (10%) quando fibroblastos foram pré-incubados com o inibidor do receptor de EGF (AG1478). Esse dado foi correlacionado com a liberação de fatores de crescimento das células com posterior atuação autócrina destas substâncias. CMS2MS2 possui 214 resíduos de aminoácidos incluindo os que formam a tríade catalítica (Cys₂₅, His₁₅₉ e Asn₁₇₅). Análises filogenéticas revelaram que CMS2MS2 está mais próxima evolutivamente da quimopapaína do que da papaína, ambas isoladas do látex de *Carica papaya*. A estrutura tridimensional predita mostrou que essa enzima mitogênica possui características típicas das proteases da família da papaína. Estes dados sugerem que mínimas diferenças estruturais podem determinar seu efeito proliferativo, o qual é independente da atividade proteolítica; mas é dependente da ativação da via das MAP-quinases. A propriedade de agir como mitógeno atribuída às cisteíno proteases isoladas de Caricaceae pode explicar algumas das aplicações farmacológicas destas proteases.

Palavras-chave: Caricaceae; cisteíno protease; efeito mitogênico; MAP-quinases