

CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DA VANILINA E AMINOFENILIDRAZINA NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE CISTEÍNO PROTEASES DE *Leishmania mexicana*

Juliana Fortes Di Iorio¹; Diogo Teixeira Carvalho²; Wagner Alves de Souza Júdice³

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: ju-fortes1@hotmail.com
2. Professor e Pesquisador da Universidade Federal de Alfenas; e-mail: diogotcarv@gmail.com
3. Professor da Universidade Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br

Área do Conhecimento: **Enzimologia**

Palavras-chave: Vanilina; aminofenilidrazina, cisteíno proteases, *Leishmania mexicana*.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por um protozoário que possui duas formas em seu ciclo biológico, a amastigota encontrada nas células do hospedeiro e a promastigota que habita o hospedeiro invertebrado (REY, 2008). Na *Leishmania mexicana* as cisteíno proteases são mais expressas na forma amastigota de mamíferos do que na forma promastigota do vetor tornando-as alvos no desenvolvimento de drogas anti-leishmanias (MOTTRAN, 1997). O eugenol é o principal componente do óleo essencial de cravo-da-índia, possui ação leishmanicida contra a *L. donovani* (ISLAMUDDIN, 2014). A vanilina é um composto cristalino, solúvel em éter e clorofórmio é usada como aromatizante para alimentos (ESPARAN, 2015). Fenilidrazinas e hidrazinas, bem como produtos naturais contendo hidrazina, foram relatados como tendo atividade antineoplásica (TOTH, 2000).

OBJETIVOS

Avaliar a atividade de compostos derivados do eugenol e fenilidrazina sobre as cisteíno proteases de tripanossomatídeos rCPB2.8, rCPB30 e rH84Y envolvidas como fatores de virulência na leishmaniose.

METODOLOGIA

Realizou-se a triagem em duas concentrações (10 μ M e 100 μ M) de 15 moléculas derivados do eugenol e fenilidrazinas. Para triagem realizou-se os ensaios enzimáticos em tampão acetato de sódio 100mM, acrescido de glicerol 20%, triton X-100 0,04%, DTT 5mM, pH 5,5 com pré-ativação por 5 min a 37°C. A atividade das enzimas foi seguida nos $\lambda_{Ex}=360\text{nm}$ e $\lambda_{Em}=480\text{nm}$ em espectrofluorímetro Hitachi-F2700, cubeta de quartzo (1mL) utilizando como substrato Z-FR-MCA. Na determinação do potencial inibitório utilizou-se concentrações crescentes dos compostos e o IC₅₀ determinado por regressão não-linear utilizando o programa Grafit 5.0. Para determinar o mecanismo de inibição utilizou-se quatro concentrações diferentes do inibidor de acordo com o perfil do gráfico de Michaelis-Menten (hipérbole retangular) e seu respectivo duplo recíproco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem de atividade dos compostos sobre as cisteíno proteases de *L. mexicana* mostraram que vários compostos apresentaram comportamento de ativação enzimática. Contudo esse comportamento de ativação não se repetia para todas as enzimas. Isso denota que as modificações estruturais entre as diferentes isoformas interferiram nos processos. Avaliando a capacidade de inibição da rCPB2.8 pelas moléculas analisadas, verificamos que os compostos mais efetivos na concentração de 10 μ M foram BB03A, BB03C e BB03E inibindo a rCPB2.8 em mais de 50%. Determinou-se o valor de IC₅₀, para o BBC03A, BBC03C e BBC03E obtendo-se 24,39 \pm 1,48 μ M, 54,93 \pm 1,84 μ M e 21,78 \pm 0,96 μ M, respectivamente. Em relação aos dados observados nos ensaios de triagem sobre a enzima rCPB3.0, verificamos inibição acima de 50% apenas por ação do composto BBC03A, BBC03B e BBC03C com valores de IC₅₀ de 33,26 \pm 0,79 μ M, 171,23 \pm 2,95 μ M e 105,17 \pm 4,29 μ M, respectivamente. Analisando a atividade dos compostos sobre a enzima rH84Y os compostos mais efetivos foram BBC03E com IC₅₀ igual a 14,47 \pm 0,89 μ M e o GVD com IC₅₀ de 38,45 \pm 1,52 μ M. A partir da seleção dos compostos, pode-se iniciar os testes para definir o mecanismo de inibição. Para a rCPB2.8 o composto BBC03A (Figura 1A) mostrou uma inibição não competitiva, pois todas as retas se interseccionam no eixo X, de acordo com o gráfico do intercepto (Figura 1.B) e inclinação (Figura 1.C) determinou-se Ki = 1,93 \pm 0,22 μ M e α Ki = 1,77 \pm 0,18 μ M, respectivamente. Com os valores de Ki e α Ki próximos, estabeleceu-se α = 1, portanto não a preferência pela enzima livre ou complexo ES. O composto BBC03C (Figura 1D) é um inibidor competitivo, devido a intersecção das retas no eixo Y, o valor de Ki é 0,987 \pm 0,097 μ M, nesta situação o composto interage exclusivamente com o sítio catalítico da enzima. O BBC03E (Figura 1F) também atua como inibidor competitivo, com valor de Ki = 3,5 \pm 0,3 μ M.

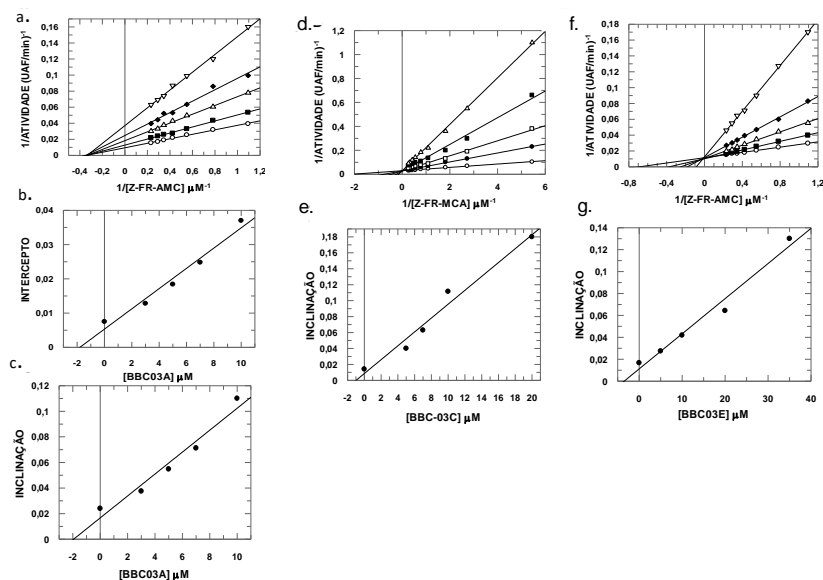


Figura 1 - Cinética de inibição da cisteíno protease rCPB2.8. A) Plote dos duplos recíprocos do BBC03A. B) Replote do intercepto. C) Replote de inclinação. D) Plote dos duplos recíprocos do BBC03C. E) Replote de inclinação. F) Plote dos duplos recíprocos do BBC03E. G) Replote de inclinação

Quanto ao perfil de inibição da enzima rCPB3.0 o composto BBC03A (Figura 2A) com valores de Ki = 10.8 \pm 0.6 μ M e α Ki=9.4 \pm 0.8 μ M, BBC03B (Figura 2D) Ki=10.4 \pm 1.1 μ M e

$\alpha K_i=12.5\pm 1.1\mu\text{M}$ e BBC03D (Figura 2G) $K_i=6.39\pm 0.35\mu\text{M}$ e $\alpha K_i=6.75\pm 0.56\mu\text{M}$, todos atuaram como inibidores não competitivos.

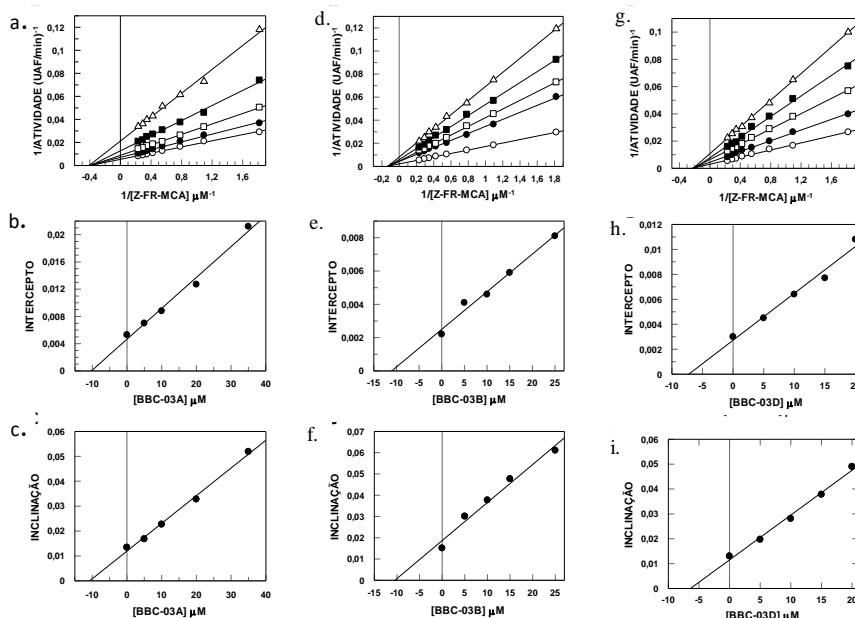


Figura 2 - Cinética de inibição da cisteíno protease rCPB3.0. A) Plote dos duplos recíprocos do BBC03A. B) Replote do intercepto. C) Replote de inclinação. D) Plote dos duplos recíprocos do BBC03B. E) Replote do intercepto. F) Replote de inclinação. G) Plote dos duplos recíprocos do BBC03D. H) Replote do intercepto I) Replote de inclinação.

Quanto a inibição da rH84Y os compostos BBC03E (Figura 3A) obteve valores de $K_i=3.65\pm 0.37\mu\text{M}$ e $\alpha K_i=3.68\pm 0.59\mu\text{M}$, GVD (Figura 3D) com $K_i=6.5\pm 0.6\mu\text{M}$ e $\alpha K_i=5.6\pm 0.6\mu\text{M}$. Ambos são inibidores não competitivos.

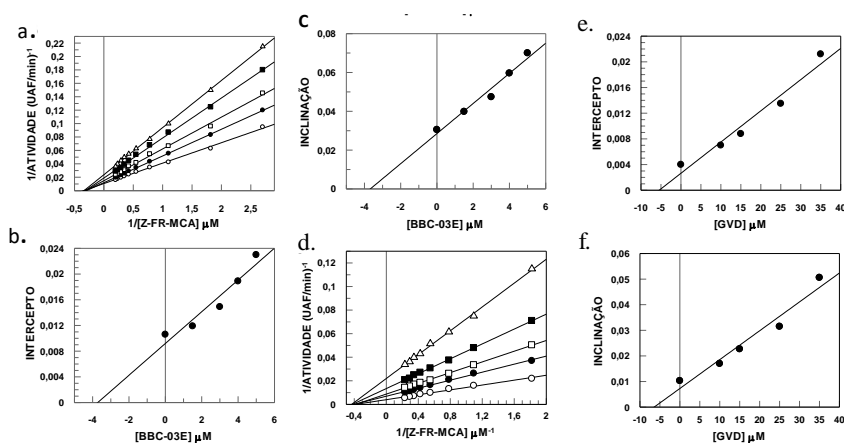


Figure 3 - Cinética de inibição da cisteíno protease rH84Y. A) Plote dos duplos recíprocos do BBC03E. B) Replote do intercepto. C) Replote de inclinação. D) Plote dos duplos recíprocos do GVD. E) Replote do intercepto. F) Replote de inclinação.

No estudo não foi encontrado um composto capaz de inibir as três enzimas, no entanto, um mesmo composto apresentou diferentes comportamentos inibitórios entre as enzimas. De

acordo com Juliano (2004) diferenças nas atividades entre as isoenzimas CPB de *L. mexicana* está associada com variações de aminoácidos em posições mais periférica da proteína. Essas informações vão ao encontro aos dados obtidos uma vez que foram observadas alterações de inibição na rH84Y, única das enzimas que apresenta uma Tyr em 84, que se encontra em uma alça externa na superfície da proteína e distante do sítio catalítico (JULIANO et al, 2004).

CONCLUSÃO

Concluimos que os derivados da vanilina e aminofenilidrazina são matrizes interessantes para o desenvolvimento de fármacos. A série dos compostos das acilidrazonas da 4-aminofenilidrazina (BBC03C) é a classe que teve pelo menos um representante como inibidor das proteases. No entanto, o mesmo inibidor mostrou diferentes comportamentos para cada enzima. Contudo, nos ensaios não foi possível ter o mesmo composto atuando como inibidor das três isoenzimas, no entanto, observou-se diferenças de afinidade entre enzima-inibidor que podem ser devido as mudanças na estrutura das moléculas testadas.

Complementado aos dados é necessário o estudo com modelagem molecular e acoplamento enzima-inibidor por bioinformática através de docagem para possível entendimento das interações.

REFERÊNCIAS

ESPARAN, V.; KRINGS, U.; STRUCH, M.; BERGER R.G. A three-enzyme-system to degrade curcumin to natural vanillin. **Molecules**, Suíça, 2015.

ISLAMUDDIN, M.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. **Journal of Medical Microbiology**, Inglaterra, v. 63, p. 74-85, 2014.

JULIANO MA, BROOKS DR, SELZER PM, PANDOLFO HL, JUDICE WA, JULIANO L, MELDAL M, SANDERSON SJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH. Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. **Eur J Biochem**, 271(18), 3704-3714, 2004.

MOTTRAM JC, FRAME MJ, BROOKS DR, TETLEY L, HUTCHISON JE, SOUZA AE, et al. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. **J Biol Chem** 272:14285–93, 1997.

REY, L. **Parasitologia**. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

TOTH, B. Hydrazines and Cancer. A guidebook on the carcinogenic activities of hydrazines, related chemicals, and hydrazine-containing natural products. **Harwood Academic Publishers**, Australia, pp.243, 2000.