

AValiação DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DO EUGENOL NA ATIVIDADE DE CISTEÍNO PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Pâmela Moraes e Silva¹; Márcia Paranho Veloso²; Wagner Alves de Souza Júdice³

1. Estudante do curso de Engenharia Química; e-mail: pamellamoraes.silva@hotmail.com
2. Professora da Unifa; e-mail: mparanho@gmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail:wagnerjudice@gmail.com

Área de conhecimento: **Enzimologia**

Palavras-chaves: Leishmaniose, cisteíno proteases, eugenol

INTRODUÇÃO

Cisteíno proteases são encontradas em diferentes espécies de *Leishmania*, as cisteíno proteases (CP) são essenciais na infectividade do parasito durante sua relação com o hospedeiro (JUDICE et al., 2013; MOTTRAM et al., 1997). Essas proteases são fundamentais no ciclo de vida e na patogenicidade de parasitas, o que as tornam alvo terapêutico (SAID e PIETRO, 2002). As variações dos resíduos nas posições 60, 61, 64 e 84 entre CPB2.8 e isoformas alteram distribuição de cargas ocasionando significativas modificações do potencial eletrostático na superfície das isoenzimas (JULIANO, 2004). O Eugenol é um produto volátil, alil fenol natural encontrado no óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), sassafrás (*Ocotea odorifera*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*), têm sido bastante estudados devido à sua riqueza química em fenóis, aldeídos e álcoois e tem atraído atenção de pesquisadores por sua ampla atividade biológica e versatilidade química (ABRÃO et al., 2015).

OBJETIVO

Realizar testes para definição dos mecanismos de inibição dos compostos morfolinicos derivados do eugenol sobre as enzimas recombinantes rCPB 2.8, rCPB 3.0 e rH84Y de *Leishmania mexicana*.

METODOLOGIA

Para realização dos testes de mecanismo de inibição foi realizada a expressão e purificação das enzimas recombinantes rCPB rCPB3.0 e rH84Y a partir de clones cedidos pelo Prof. Dr. Jeremy C. Mottram, do Centro de Imunologia e Infecção, do Departamento de Biologia da Universidade de York, Reino Unido, na qual o gene de cada enzima foi inserido em plasmídeo pQe30. Assim, foi inserido o plasmídeo na bactéria *Escherichia coli* para expressão em 700 mL de meio de cultura com adição do IPTG, o indutor de expressão. A fase final, a purificação, foi realizada em coluna de níquel por cromatografia de afinidade. Os mecanismos de inibição foram realizados utilizando os compostos morfolinicos derivados de eugenol SBM3 e SBM11, já anteriormente testados, realizando curvas de Michaelis-Menten com adições crescentes concentrações dos compostos, e com isso os plotes de inclinação (1/V em função de 1/S) e replotes de inclinação determinando a constante de dissociação do complexo enzima-substrato, para assim realizar a análise de como o composto interage com a enzima.

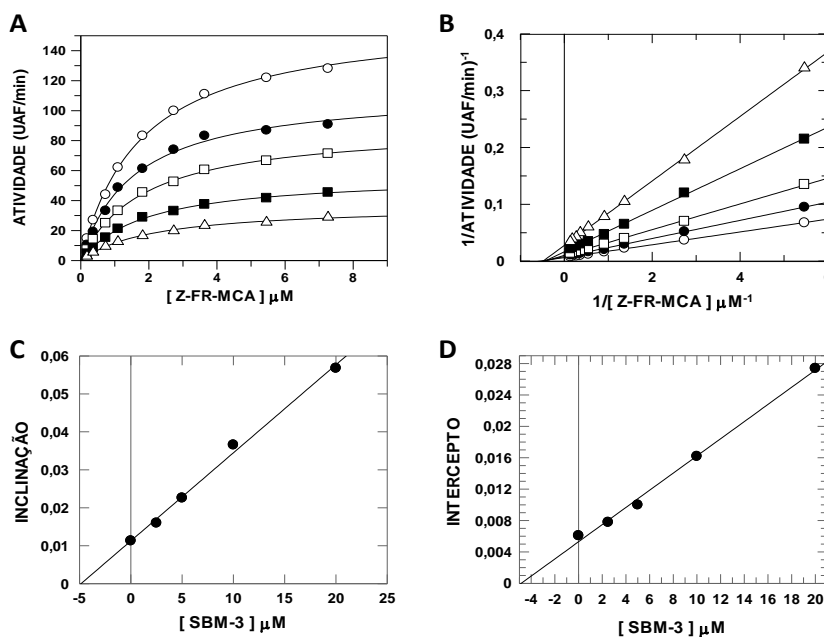
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizado a seleção dos compostos com os melhores valores de IC_{50} , para definição do potencial inibitório, conforme **Tabela 1**, feitos os testes de mecanismo de inibição. Foram identificados dois diferentes tipos de mecanismos de inibição, sendo esses do tipo não competitivo linear simples (**Figura 1**) e cooperatividade positiva (**Figura 2**).

Tabela 1: Valores de IC_{50} dos compostos SBM3 e SBM11

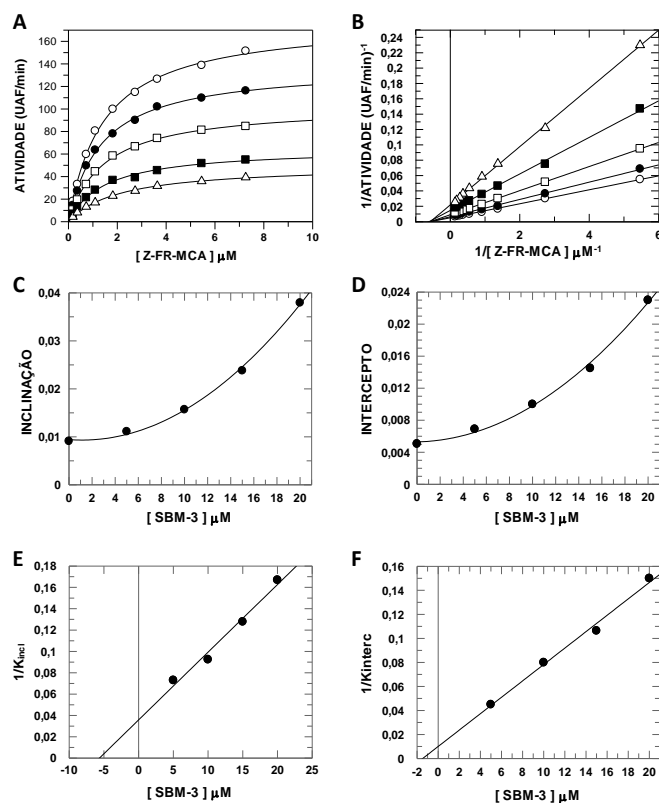
| Composto | IC_{50} (μM) | | |
|--------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | rCPB2.8 | rCPB3.0 | rH84Y |
| SBM3 | $1,7 \pm 0,1$ | $3,8 \pm 0,2$ | $6,1 \pm 0,1$ |
| SBM11 | $1,7 \pm 0,06$ | $33,49 \pm 0,8$ | $40,77 \pm 0,9$ |

Figura 1: Cinética de mecanismo de inibição da enzima rCPB3.0 pelo composto SBM3 (não competitiva linear simples)



A) plote de Michaelis-Menten; **B)** plote dos inversos (Lineweaver-Burk); **C)** replote da inclinação; **D)** replote do intercepto. Em A e B: $\circ \rightarrow$ controle; $\bullet \rightarrow$ 2,5 μM ; $\square \rightarrow$ 5 μM ; $\blacksquare \rightarrow$ 10 μM ; $\triangle \rightarrow$ 20 μM .

Figura 2: Cinética de mecanismo de inibição da enzima rH84Y pelo composto SBM3 (cooperatividade)



A) Plote de Michaelis-Menten; **B)** plote dos inversos (Lineweaver-Burk); **C)** replote da inclinação; **D)** replote do intercepto. Em A e B: ○→ controle; ●→ 5uM; □→ 10uM; ■→ 15uM; △→ 20uM.

A partir do replote de inclinação foi possível adquirir o valor de K_i para cada teste realizado, presente na **Tabela 2**, na qual de modo geral percebe-se que a maioria está abaixo de 8uM, mostrando uma boa afinidade dos compostos pelas enzimas testadas, porém o teste com compostos SBM3 para a enzima rH84Y, além de apresentar um mecanismo de inibição diferente dos demais, do tipo cooperatividade, mostra um valor de K_i mais elevado em relação aos outros valores indicando uma menor afinidade com a enzima rH84Y em comparativo com as outras enzimas ou um erro de execução do teste.

Tabela 4: Valores de K_i para os testes de mecanismo de inibição dos compostos morfolinicos derivados do eugenol

| ENZIMA | COMP | uM | | | | | | |
|---------|--------|-----------|--------------|-------------|--------------|----------|---------|----------|
| | | K_i | αK_i | βK_i | γK_i | α | β | γ |
| rCPB2.8 | SBM-3 | 2,93±0,29 | 6,82±0,89 | ----- | ----- | 2,27 | ----- | ----- |
| | SBM-11 | 6,15±0,08 | 5,75±0,01 | ----- | ----- | 1 | ----- | ----- |
| rCPB3.0 | SBM-3 | 4,91±0,43 | 4,82±0,18 | ----- | ----- | 1 | ----- | ----- |
| | SBM-11 | 8,22±0,65 | 13,05±0,85 | ----- | ----- | 1,6 | ----- | ----- |
| rH84Y | SBM-3 | 25±2 | 100±12 | 5,7±0,5 | 1,5±0,1 | 3,57 | 0,20 | 0,05 |
| | SBM-11 | 4,58±0,37 | 4,83±0,32 | ----- | ----- | 1 | ----- | ----- |

CONCLUSÃO

Com os dados, a partir dos testes realizados os compostos SBM3 e SBM11 derivados do eugenol possuem bom potencial de inibição das isoformas da enzima recombinantes de *Leishmania mexicana* possuindo valores de K_i menores que 8 μ M em um geral.

Mas para melhor comparação dos resultados alguns testes ainda necessitam ser realizados. Os valores de K_i fazem dessa classe de compostos interessantes moléculas para estudo e desenvolvimento de drogas leishmanicidas.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, P.H.O.; PIZI, R.B.; SOUZA, T.B.; FREGNAN, A.M.; SILVA, F.; COELHO, L.F.L.; MALAQUIAS, L.C.C.; DIAS, D.F.; VELOSO, M.P.; CARVALHO, D.T. Synthesis and biological evaluation os new eugenol Mannich bases as promising antifungal agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 459-465, 2015.

COPELAND, R.A. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, New Jersey, **Wiley**, 2005.

JUDICE, W.A.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; JULIANO MA, JULIANO L. Specific negative charges in cysteine protease isoforms of *Leishmania mexicana* are highly influential on the substrate binding and hydrolysis. **Molecular and Biochemical Parasitology Journal**, v. 144, n. 1, p. 36-43, 2005.

JULIANO, M.A.; BROOKS, D.R.; SELZER, P.M.; PANDOLFO, H.L.; JUDICE, W.A.; JULIANO, L.; MELDAL, M.; SANDERSON, S.J.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. **European Journal of Biochemistry**, v. 271; n. 18, p. 3704-3714, 2004.

MOTTRAM JC, Frame MC, Brooks DR, 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** 1997;272:14285–93.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Editora Eventos, 2002, 121 p.