

## Caracterização de compostos derivados de nitrofurazona frente à protease do vírus da Febre Aftosa Lb<sup>pro</sup>

Bianca Calado Martinho<sup>1</sup>; Marcella Araújo Manfredi<sup>2</sup>; Wagner Alves de Souza Júdice<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; biancamartinho@bol.com.br<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Doutorado em Biotecnologia; marcella\_manfredi@hotmail.com<sup>2</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; wagnerjudice@gmail.com<sup>3</sup>

Área do Conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: protease, Lb<sup>pro</sup>, febre-aftosa, nitrofurazona, hidroximetilnitrofurazona.

### INTRODUÇÃO

Cisteíno proteases desempenham importante papel no metabolismo proteico celular, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, e na degradação de proteínas de matriz extracelular e de estarem envolvidas em muitas patologias - em todas as etapas da progressão tumoral, na doença de Alzheimer, na distrofia muscular e na artrite reumatóide (SIEWINSKI *et. al.*, 1994), a papaína é a mais estudada das cisteíno proteases havendo uma vasta bibliografia a respeito e foi a primeira desse grupo a ter sua estrutura tridimensional determinada (DRENTH *et. al.*, 1968), conseqüentemente, foi considerada a enzima modelo para o estudo das outras cisteíno proteases. O estudo dessas enzimas é de grandes importâncias para o combate das doenças a que estas proteases estão associadas, estabelecerem as relações entre seqüência primária de aminoácidos, estrutura e o papel biológico. A proteinase “leader” (L<sup>pro</sup>) da FMDV (Foot-and-Mouth Disease Vírus – vírus da febre aftosa) e rinovírus equino são mecanisticamente e estruturalmente relacionadas à família das cisteíno-proteinases papaína-símile (GUARNÉ *et. al.*, 1998; SKERN *et. al.*, 1998), as quais são caracterizadas pela tríade catalítica Cys/His/Asn. A L<sup>pro</sup> FMDV possui os resíduos de cisteíno e histidina catalítica, entretanto, a asparagina catalítica encontra-se substituída pelo resíduo de aspártico (GORBALENYA *et. al.*, 1991; SKERN *et. al.*, 1998). Além do mais, a interação entre os resíduos de histidina e o aspártico é exposta para o solvente, como os resíduos triptofano que estão ausentes. Uma diferença adicional é a estabilização do intermediário estado de transição por um resíduo de asparagina (GUARNÉ *et. al.*, 1998). Essas características fazem da L<sup>pro</sup> única entre a família das proteinases papaína-símile. Em estudos sobre a inibição da cisteíno protease *cruzaína* de *Trypanosoma cruzi*, o composto *nitrofurazona* (NF) e seu derivado *hidroximetilnitrofurazona* (NFOH) foram testados frente à inibição desta enzima, mostrando-se ativos. Uma concentração de 10 µM de NF reduziu em 30% a atividade enzimática da *cruzaína*, enquanto que a mesma concentração de NFOH foi capaz de reduzir em 60% a atividade enzimática. Valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos em torno de 22,83 ± 1,2 µM para NF e em torno de 10,55 ± 0,83 µM para NFOH (TROSSINI *et. al.*, 2000).

De acordo com os resultados obtidos na literatura, ficou evidente o potencial inibitório destes compostos contra a cisteíno proteases, portanto, o objetivo principal deste trabalho busca avaliar e caracterizar compostos análogos da NF e NFOH, como possíveis inibidores da cisteíno protease do vírus da febre aftosa Foot and Mouth Disease Virus (FMDV).

## OBJETIVOS

O presente projeto de iniciação científica tem por objetivo o estudo de moléculas derivadas de análogos da Nitrofurazona e da Hidroximetilnitrofurazona como possíveis inibidores da cisteína protease do vírus da febre aftosa Foot and Mouth Disease Virus (FMDV).

## METODOLOGIA

A construção do plasmídeo foi realizada pelo Prof. Tim Skern do Max F. Perutz Laboratories-University Departments at the Vienna Biocenter, Department of Medical Biochemistry, Division of Biochemistry, University of Vienna-Austria. O mesmo foi gentilmente cedido pelo pós-doutorando Jorge Alexandre Nogueira Santos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo. O substrato Cbz-FR-MCA (Z-Phe-Arg-MCA ou carbobenzoil fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina ou benziloxycarbonil-fenilalanina-arginina-4-metil-7-coumarilamida) foi adquirido da empresa Bachem. Inc. e Sigma e sua concentração determinada em função da massa molar e volume de solução preparada. Os compostos derivados de NF e NFOH a serem testados como possíveis inibidores da enzima Lb<sup>pro</sup> foi gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo H. G. Trossini do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP. O valor de IC<sub>50</sub> é definido pela concentração de inibidor responsável por provocar uma queda de 50% na atividade da enzima. O valor de 50% é apenas uma convenção criada com o objetivo de se comparar valores de potência de inibidores entre si. Os ensaios de inibição para determinação dos valores de IC<sub>50</sub> foram realizados nas mesmas condições dos procedimentos de titulação enzimática, ou seja, as enzimas foram ativadas com 5 mM de DTT por 5 minutos a 35°C, e no tampão borato/borax 50mM acetato de sódio 100mM, pH 7,8, em cubeta de cristal de quartzo de 1 mL. Os parâmetros cinéticos foram determinados usando o programa Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltda) (OLIVEIRA *et. al.*, 1992).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de inibição foram realizados com 9 compostos derivados de Nitrofurazona e da Hidroximetilnitrofurazona, de acordo com métodos apresentados previamente. Concentrações crescentes dos compostos foram adicionadas para promover o decaimento da atividade enzimática possibilitando o plote de gráficos de inibição. Os resultados obtidos foram apresentados na **Tabela 1**, fornecendo valores de IC<sub>50</sub> (µM).

**Tabela 1:** Valores de IC<sub>50</sub> da enzima Lb<sup>pro</sup> frente aos compostos derivados de NF e NFOH.

INIBIDOR	RESULTADOS
	IC <sub>50</sub> (µM)
FG007	1,93±0,16
FG011	2,82±0,17
FG012	1,23±0,18
FG013	1,31±0,06
LU008	*
LU011	2,74± 0,11
LU012	3,57± 0,18
LU016	14,79±1,50
LU017	*

\*Os compostos LU008 e LU017 se comportaram como ativadores

## CONCLUSÃO

Um total de 6 compostos derivados de Nitrofurazona e da Hidroximetilnitrofurazona foram capazes de inibir a protease do vírus da febre aftosa com valores de IC50 variando de 1,23 a 3,57 $\mu$ M. Interessantemente, duas das moléculas analisadas comportaram-se como ativadores enzimáticos.

Nossos dados mostram que derivados de Nitrofurazona e da Hidroximetilnitrofurazona são moléculas potenciais para o desenvolvimento de drogas de cunho veterinário no combate à febre aftosa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DRENTH, J.; JANSONIUS, J.N.; KOEKOEK, R.; SWN, H. M.; WOLTERS, B.G. (1968) *Nature* 218(145):929-932.

GORBALENYA, A.E., KOONIN, E.V.; LAI, M.M. (1991). *FEBS Letters*. 288, 201-205.

GUARNÉ, A.; TORMO, J.; KIRCHWEGER, K.; PFISTERMUELLER, D.; FITA, I.; SKERN, T. (1998). *EMBO J.* 17, 7469-7479.

OLIVEIRA, M.C.F.; HIRATA, I.Y.; CHAGAS, J.R.; BOSCHCOV, P.; GOMES, R.A.S.; FIGUEIREDO, A.F.S; JULIANO, L. (1992). *Analytical Biochemistry*, v. 203, p. 39-46.

SIEWINSKI, M.; GUTOWICZ, J.; KIELAN, W.; BOLANOWKI, M. (1994) *Oncology* 51: (5) 446-449.

SKERN, T.; FITA, I.; GUARNÉ, A. (1998). *J. Gen. Virol.* 79, 301-307.

TROSSINI, G.H.G.; MALVEZZI, A.; T-DO AMARAL, A.; RANGEL-YAGUI, C.O.; IZIDORO, M.A.; CEZARI, M.H.S.; JULIANO, L.; CHIN, C.M.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. (2010). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 25, p. 62-67.