

DERIVADOS ALQUILTRIAZÓLICOS E ALQUILFOSFOLIPÍDIOS COMO INIBIDORES DE PROTEASES LISSOMAIS DA FAMÍLIA DAS CATEPSINAS

Bianca Yoshie Ikari¹, Vanessa Silva Gontijo², Rossimiriam Pereira Freitas³, Alyne Alexandrino Antunes⁴, Ricardo José Soares Torquato⁵, Wagner Alves de Souza Júdice⁶.

Estudante do Curso de Biomedicina da Universidade de Mogi das Cruzes; biancaikari@outlook.com.¹

Estudante de Doutorado da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química; vanessagontijo@yahoo.com.br.²

Professor da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química; rossipdf@yahoo.com.br.³

Estudante de Doutorado da Universidade de Mogi das Cruzes. alexandrinoaa@gmail.com.⁴

Técnico de Nível Superior, Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Bioquímica; torquato.bioq@epm.br.⁵

Professor e pesquisador da Universidade de Mogi das Cruzes, CIIB; wagneras@umc.br.⁶

Área do conhecimento: Enzimologia

Palavras chaves: Inibidores, cisteíno proteases, catepsina L.

INTRODUÇÃO

As cisteíno proteases são conhecidas por desempenharem importante papel no metabolismo proteico celulares, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, e na degradação de proteínas de matriz extracelular e por estarem envolvidas em muitas patologias, em todas as etapas da progressão tumoral, na doença de Alzheimer, na distrofia muscular e na artrite reumatóide (Mort & Buttle, 1997).

As catepsinas possuem diversas funções específicas como processo de degradação proteica durante a morte celular por necrose ou autofagia, apresentação antigênica mediada por MHC de classe II, diferenciação de queratinócitos, ativação de pró-hormônios, entre outros (Turk et al, 2000). Os inibidores enzimáticos são substâncias que tem a capacidade de interferir em uma reação de catálise enzimática, assim podendo reduzir ou estacionar um processo de reação ou especificidade biológica (Nelson et al, 2006).

Alquilfosfolipídios como os fármacos miltefosina e perifosina são utilizados no tratamento de tumores e leishmaniose humana e canina (Woerly et al, 2009).

Estudos de relação estrutura-atividade de alquilfosfolipídios revelam que a cadeia alquílica longa e um grupo polar são essenciais para a atividade antitumoral. Nos últimos anos, um número grande de trabalhos tem relatado a síntese e a atividade biológica de vários derivados destes fármacos. Vários trabalhos apresentam o uso de 1,2,3-triazóis como substâncias com atividade anti-HIV (Whiting et al, 2006) ou contra vírus da herpes simples tipo 1 (HSV-1), herpes simplex tipo 2 (HSV-2), varicela-zoster (VZV TK⁺ e TK⁻) e citomegalovírus. Outra atividade descrita para essa classe de compostos é a antimicrobiana (Gonzaga et al, 2013) além da atividade inibidora de

enzimas como, por exemplo, a inibição da enzima FabG4 (Rv0242c) de *Mycobacterium tuberculosis*, dentre outras (Banerjee et al, 2014). A atividade anticancerígena tem sido também intensamente relatada para compostos triazólicos (Praveena et al, 2014).

OBJETIVOS

Caracterizar moléculas derivadas de alquiltriaazólicos e alquilfosfolipídios como potenciais inibidores da catepsina L.

METODOLOGIA

Catepsina L recombinante humana foi expressa e purificada de acordo com as técnicas de Linnevers e colaboradores (Linnevers et al, 1997),

Os compostos sintéticos derivados de **alquiltriaazólicos e alquilfosfolipídios** foram cedidos pela Profa. Profa. Rossimiriam Pereira de Freitas LABSINTO - Laboratório de Síntese Orgânica Departamento de Química-ICEx - Universidade Federal de Minas Gerais.

Nos ensaios cinéticos da catepsina L foi usado tampão acetato de sódio 100 mM, com 5 mM de EDTA, pH 5,5. Aliquotas da enzima foi pré-incubada com DTT 5 mM durante 5 minutos a 37°C. Sua hidrólise foi seguida pela medição da fluorescência (substrato Z-FR-MCA → $\lambda_{ex} = 360$ nm e $\lambda_{em} = 480$ nm) em um espectrofluorímetro Hitachi F2500. Determinaram-se os parâmetros cinéticos por regressão não linear usando o programa Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltda).

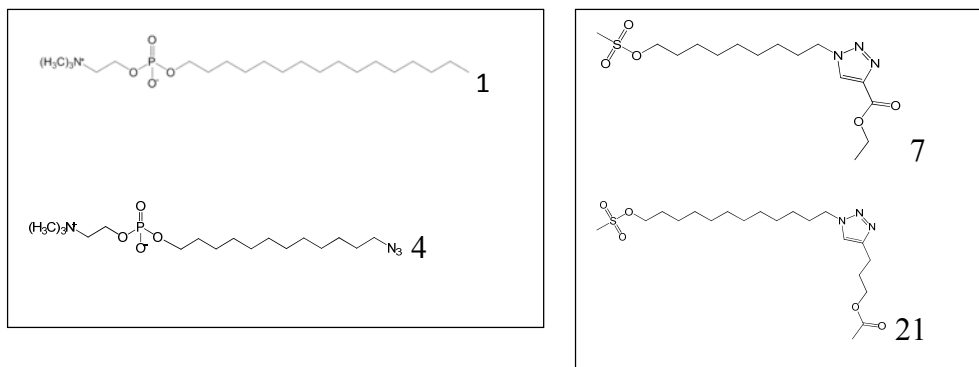
Os ensaios de inibição da protease foram similares aos ensaios de hidrólise de substratos, entretanto, após a ativação enzimática e medição da atividade inicial da catepsina, procedeu-se a adição de concentrações crescentes de inibidor até a estabilização do decaimento da atividade enzimática em que a velocidade de reação altere significativamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inibição da catepsina L pelos compostos derivados de alquiltriaazólicos e alquilfosfolipídios mostrou que as moléculas 1, 21 e 5 são os mais potentes na inibição desta cisteína protease lisossomal, com valores de IC₅₀ de 1,04; 1,3 e 6,1 μM respectivamente (Tabela 1).

Verificamos que o composto 1 foi aproximadamente entre 10 e 358 vezes mais efetivo na inibição da catepsina L que os demais compostos.

Figura 1: Moléculas dos compostos alquilfosfolipídios (1 e 4) e alquiltriaazólicos (7 e 21)



O mais potente dos compostos na inibição da catepsina L (composto 1,) denominado miltefosina, já é comercializado em vários países e foi a primeira droga de uso oral usada no tratamento da Leishmaniose Visceral.

TABELA 1: Valores de IC₅₀ na inibição da catepsina L pelos compostos alquilfosfolipídios e alquiltriazólicos.

#	IC ₅₀ μM	#	IC ₅₀ μM	#	IC ₅₀ μM
1	1,04 ± 0,02	8	66 ± 3	15	52 ± 5
2	92 ± 13	9	97 ± 3	16	106 ± 4
3	29,1 ± 1,6	10	144 ± 7	17	373 ± 25
4	11,9 ± 0,7	11	105 ± 8	18	17,6 ± 0,8
5	6,1 ± 0,7	12	150 ± 4	19	10,9 ± 0,4
6	340 ± 11	13	111 ± 3	20	14 ± 1
7	132 ± 11	14	242 ± 7	21	1,30 ± 0,04

O genoma da Leishmania consiste de genes das cisteíno proteases multi cópia da catepsina L e simples cópia da catepsina B (Mundodi et al, 2002). Dessa forma, é possível que a miltefosina esteja atuando como fármaco no tratamento da Leishmaniose por meio da inibição da catepsina L.

Comparando as moléculas dos compostos 1 e 21, que apresentaram valores de IC₅₀ muito próximos (1,04 e 1,3, respectivamente) verificamos que o primeiro é uma alquilfosfolipídeo enquanto que o segundo é um alquiltriazólico.

Em relação às estruturas dos compostos 1 e 4, a presença do grupo azida (-N₃) ligado ao grupo alquil promoveu uma redução de aproximadamente 11 vezes no potencial inibitório.

No tocante a estrutura do composto 7 (alquiltriazólico) verificou-se que a proximidade do grupo carbonila ao anel triazólico promoveu uma redução do potencial inibitório IC₅₀ comparativamente ao composto 21, o qual apresenta um espaçador de 2 carbonos entre o grupo carbonila e o anel triazólico, em aproximadamente 100 vezes. Esse evento pode estar facilitando a interação do oxigênio da carbonila do composto 21 a aminoácidos do sítio ativo da enzima.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que tanto o composto comercial miltefosina (composto 1) e o composto 21 são fortes candidatos para desenvolvimento de drogas em patologias em que a cisteíno protease catepsina L esteja envolvida.

Estruturas compostos 1, 4, 7 e 21.

AGRADECIMENTOS: FAEP, FAPESP, CNPq.

REFERÊNCIAS

BANERJEE DR, DUTTA D, SAHA B, BHATTACHARYYA S, SENAPATI K, DAS AK, BASAK A. Design, synthesis and characterization of novel inhibitors against mycobacterial β -ketoacyl CoA reductase FabG4. **Org. Biomol. Chem.**, 12, 73-85, 2014.

GONZAGA DT, DA ROCHA DR, DA SILVA FDE C, FERREIRA VF. Recent advances in the synthesis of new antimycobacterial agents based on the 1*H*-1,2,3-triazoles. **Curr. Topics in Med. Chem.**, 13, 2850-2865, 2013.

LINNEVERS, C.J.; MCGRATH, M.E.; ARMSTRONG, R.; MISTRY, F.R.; BARNES, M.G.; KLAUS, J.L.; PALMER, J.T.; KATZ, B.A.; BROMME, D. Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex. **Protein Science**, v. 6, p. 919-921, 1997.

MORT, JS. E BUTTLE, DJ. Cathepsin B - **Int J Biochem Cell B** 29: (5) 715-720, 1997.

MUNDODI V, SOMANNA A, FARRELL PJ, GEDAMU L. Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. **Gene** 282: 257-265, 2002

NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER, A.L. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

PRAVEENA KS, DURGADAS S, SURESH BABU N, AKKENAPALLY S, GANESH KUMAR C, DEORA GS, MURTHY NY, MUKKANTI K, PAL S. Synthesis of 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoliny substituted 1,2,3-triazol derivatives: their evaluation as potential PDE 4B inhibitors possessing cytotoxic properties against cancer cells. **Bioorg. Chem.**, 53, 8-14, 2014.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V.; Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 98-111, 2000.

WHITING M, MULDOON J, LIN YC, SILVERMAN SM, LINDSTROM W, OLSON AJ, KOLB HC, FINN MG, SHARPLESS KB, ELDER JH, FOKIN VV. Inhibitors of HIV-1 protease by using *in situ* click chemistry. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 45, 1435-1439, 2006.

WOERLY V, MAYNARD L, SANQUER A, EUN HM. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitol. Res.**, 105, 463-469, 2009.