

CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES PARA AS CISTEÍNO PROTEASES DE *Leishmania mexicana* ENVOLVIDAS COMO FATORES DE VIRULÊNCIA NA LEISMANIOSE

Hélida Mara Carvalho¹; Wagner Alves de Souza Júdice²

Graduada do curso de Farmácia; e-mail: helida-carvalho@hotmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com²

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Leishmaniose, cisteíno proteases, ciclopaladados

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são parasitoses que apresentam manifestações clínicas muito diversas afetando milhões de pessoas, principalmente em países menos desenvolvidos. Estas parasitoses são reunidas em quatro grupos distintos: leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa, cutâneo difusa e visceral (REY, 2010). A espécie *Leishmania mexicana* provoca dois tipos de leishmaniose: a cutânea e a cutânea difusa. O vetor da doença é o mosquito *Lutzomyia*, onde somente a fêmea pratica a hematofagia. Os protozoários do gênero *Leishmania* se encontram em apenas duas formas durante o seu ciclo vital, amastigota e promastigota (CIMERMAN, B, CIMERMAN, S., 2005). As cisteínas proteases desempenham importantes funções na forma amastigota presente nos mamíferos constituindo assim, novos alvos terapêuticos a fim de se contornar os problemas encontrados com os antimoniais pentavalentes, drogas utilizadas no tratamento da doença, que entre outras coisas apresentam alto custo, elevada toxicidade e eficácia nem sempre completa. Estas enzimas existem como múltiplas isoformas, as quais podemos destacar a rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y. DIAS *et al*, 2009). Compostos ciclopaladados vêm sendo estudados como agentes antitumorais e no controle de doenças causadas por tripanossomatídeos.

OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo a caracterização de compostos ciclopaladados como possíveis inibidores da cisteíno protease tipo B rCPB2.8 e suas isoformas, rCPB3.0 e rH84Y de *Leishmania mexicana* envolvidas como fatores de virulência na leishmaniose.

METODOLOGIA

Ensaio de Hidrólise de Substrato Fluorescente

A enzima rCPB2.8 foi incubada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e ativada com 2,5 mM de ditionitrito (ativador de cisteíno proteases) por 5 minutos a 37°C e a reação iniciada pela adição de substrato carboxibenzoil-fenil-arginil ácido metilcoumarínico (Z-FR-MCA), concentração 10 vezes o Km da enzima. Sua hidrólise foi seguida pela medição da fluorescência do grupo MCA (ácido metilcoumarínico) em comprimentos de onda de excitação λ_{ex} 360 nm e emissão λ_{em} 480 nm em um espectrofluorímetro Hitachi F2500 (CHAGAS, JULIANO, PRADO, 1991; OLIVEIRA *et al*, 1996; WILKINSON, 1961).

Ensaio de Inibição

Os ensaios de inibição foram similares ao ensaio de hidrólise de substratos, entretanto, após a ativação enzimática e medição da atividade inicial da rCPB2.8, em velocidade máxima de reação enzimática, procedeu-se a adição de concentrações crescentes de inibidor até a não observação da redução da atividade enzimática em que a velocidade de reação permanecesse constante (CHAGAS, JULIANO, PRADO, 1991; OLIVEIRA *et al*, 1996; WILKINSON, 1961).

Classificação dos Compostos Ciclopaladados

Os compostos ciclopaladados são designados por letras e números, a partir de uma nomenclatura de uso interno no laboratório. Estes compostos foram classificados em quatro grupos, **grupo A**: SE11, SE12, RE11, RE12, 44(A), 45 (A), 70(A), SF11, SF12 e 10(A), **grupo B**: D2E11, D2E12, D2F11, D2F12 e D2, **grupo C**: RcPd-E11, RcPd-E12 e RcPd, e por ultimo o **grupo D**: 35(B) e 36(B), conforme o agente de ciclometalação utilizado durante sua síntese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todos os compostos foram obtidos valores de IC₅₀, ou seja, concentração inibitória para reduzir em 50% a atividade enzimática. Esses valores foram obtidos construindo um gráfico da velocidade da enzima em função da concentração do inibidor e os dados se ajustaram a equação abaixo para cálculo de IC₅₀ utilizando-se o programa Gnit versão 5.0.13 (Eritacus Software Ltda).

$$y = \frac{100 \%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s}$$

Segue abaixo o gráfico representativo dos ensaios de inibição, exemplificando o processo de tratamento de dados, com sua respectiva tabela com os valores das concentrações de inibidor utilizadas, bem como a atividade residual enzimática apresentada em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (UAF/min) do composto D2F12.

Tabela 1: velocidade de inibição em relação às concentrações do composto D2F12 para a enzima rCPB2.8.

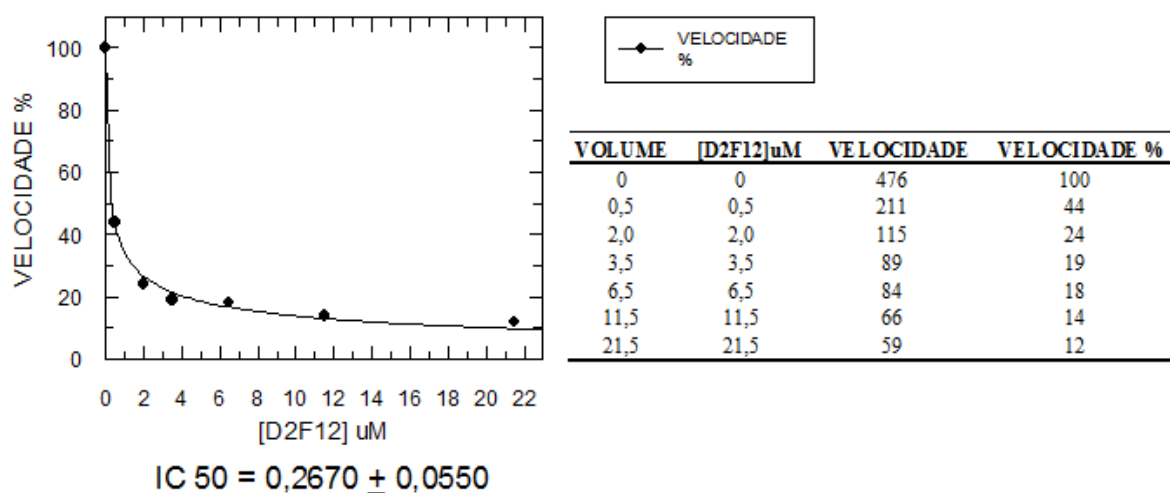


Gráfico1: correlação entre a velocidade da enzima rCPB2.8, convertida em porcentagem, e a concentração do inibidor D2F12 em uM.

A tabela 2 apresenta os valores de IC₅₀ determinados em função dos resultados obtidos a partir dos gráficos e tabelas conforme apresentado acima no modelo.

Tabela 2: enzima rCPB2.8 e suas isoformas rCPB3.0 e rH84Y com os respectivos compostos ciclopaladados analisados e seus IC₅₀.

Composto Ciclopaladado	IC ₅₀ uM		
	rCPB2.8	rCPB3.0	rH84Y
10(A)	29,01	6,79	4,37
35(B)	0,59	0,45	0,88
36(B)	70,88	16,44	21,33
44(A)	25,63	5,28	10,37
45(A)	93,12	23,75	4,00
70(A)	27,77	12,81	15,83
D2	38,67	11,84	5,99
D2E11	15,45	17,39	4,73
D2E12	4,96	1,66	4,09
D2F11	4,25	5,81	9,59
D2F12	0,27	20,48	12,32
RcPd	26,60	3,90	1,88
RcPd-E11	10,76	0,69	10,02
RcPd-E12	91,14	2,55	10,01
RE11	9,35	13,72	8,10
RE12	2,99	29,93	5,12
SE11	6,14	13,05	3,07
SE12	7,49	18,97	12,35
SF11	4,30	8,89	8,88
SF12	9,90	12,88	10,90

O grupo A dos ciclopaladados é o que apresenta o maior número de membros sendo o agente de ciclometalação o composto N,N-dimetil-1-fenetilamina (dmpa). Deste grupo, o composto RE12 foi o mais efetivo na inibição da rCPB2.8 com IC₅₀=2,99 uM. Em relação à rCPB3.0, o composto 44(A) com IC₅₀=5,28 uM foi o mais potente. Para a enzima rH84Y observamos que o ciclopaladado SE11 foi o mais efetivo com IC₅₀=3,07 uM.

Analisando os resultados de IC₅₀ dos membros do grupo B contendo o agente de ciclometalação N-benzil-N-metiletanolamina, observamos que o composto D2F12, foi o mais efetivo na inibição da enzima rCPB2.8 (IC₅₀=0,27 uM), porém, para as enzimas rCPB3.0 e rH84Y esteve entre os de menor atividade inibitória.

Os compostos pertencentes ao grupo C, apresentando o agente de ciclometalação benzonidazol, o qual é um dos fármacos de referência no tratamento da doença de Chagas, apresentou bons valores de IC₅₀ na inibição da rCPB3.0. Para a rCPB2.8 estes compostos foram ruins. Para a enzima rH84Y o composto RcPd foi o segundo melhor.

No grupo D, formado apenas por dois compostos tendo o agente de ciclometalação o Cl-PyPheEt, foi encontrado o composto mais promissor, o 35(B). Este obteve a maior atividade inibitória para duas das três enzimas testadas, rCPB3 e rH84Y com IC₅₀=0,45µM e IC₅₀=0,88µM, respectivamente e a segunda maior para a rCPB3.0. Conforme visto na tabela 2.

CONCLUSÃO

Com os resultados aqui apresentados será possível estabelecer um protocolo de testes dos melhores compostos tanto em cultura de células bem como *in vivo*, para real caracterização de suas efetivas ações e assim determinar se tais compostos atuam via inibição enzimática ou não. Porém, um fator que dificulta encontrar uma droga efetiva à

leishmaniose, em especial, a causada pela *L. mexicana* está diretamente relacionada à complexidade gênica. O gene de CPB da *L. mexicana* é um agrupamento de 19 genes em tandem que fornece ao parasita um mecanismo de escape, pois as isoformas apresentam características físico-químicas diferentes (JUDICE *et al*, 2005). Isto dificulta o desenvolvimento de drogas baseados na atividade inibitória, porém, do mesmo modo que atualmente o controle da carga viral do vírus do HIV está direcionado no uso de um coquetel de drogas, será possível, neste contexto, o desenvolvimento de coquetéis de inibidores enzimáticos que apresentam baixa toxicidade e alta potência inibitória (JUDICE *et al*, 2005).

REFERÊNCIAS

CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. **Analytical Biochemistry**, United States v. 192, n. 2, p. 419 – 425, fev. 1991.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 39 a 56.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectiva no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 10 novembro 2009.

JUDICE, W. A. S.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; JULIANO, M. A.; 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**, United States, v. 144, n. 1, p. 36-43, 11 agosto 2005.

OLIVEIRA, M. C. F.; HIRATA, I. Y.; CHAGAS, J. R.; BOSCHCOV, P; GOMES, R. A. S.; FIGUEIREDO, A. F. S.; JULIANO, L. Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. **Analytical Biochemistry**, United States, v.203, n. 1, p. 39-46, 15 maio 1992.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 62 a 74.

WILKINSON, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochemistry Journal**, United States, v.80, n. 2, p. 324-332, ago. 1961