REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DE ANÁLOGOS ISOXAZÓLICOS SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA DE CISTEÍNO PROTEASES DE *Leishmania mexicana*

Alison de Jesus Teixeira[1], Ivy Naomi Komai[2], Luan dos Santos Vianna[3], Wagner Alves de Souza Judice[4]

1- Estudante - curso de Farmácia; e-mail: alisondejesus65@gmail.com;
2- Estudante - curso de Farmácia; e-mail: ivy.naomi@gmail.com;
3- Doutorando em Biotecnologia - UMC; e-mail: luan.quimica25@gmail.com;
4- Professor - UMC; e-mail: wagneras@umc.br.

Área de conhecimento: Enzimologia.

Palavras-chave: Leishmanioses; Cisteíno Proteases; Isoxazóis; Inibição Enzimática.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose, causada por parasitas do gênero *Leishmania*, é considerada uma das doenças infecciosas negligenciadas mais importantes, visto que de 400 milhões de pessoas que estão susceptíveis à infecção, cerca de 14 milhões chegam a ser infectadas (AZEVEDO & MARCILI, 2020). O gênero *Leishmania* possui um ciclo de vida que se inicia pela picada de um mosquito hematófago (geralmente o flebótomo *Lutzomia longipalpis*) no hospedeiro susceptível, inoculando de formas promastigotas que são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear e convertidas nas formas amastigostas, as quais se multiplicam, levando ao rompimento celular e infectando tecidos e outros macrófagos. O ciclo continua com o repasto pelas fêmeas de flebotomíneos, que ingerem formas amastigotas e propiciam sua conversão para promastigotas metacíclicas infectivas (REY, 2017). Fatores ambientais e genéticos estão relacionados com a virulência de *Leishmania*, assim como determinantes moleculares (proteínas), que são essenciais no estabelecimento da infecção. Dentre as moléculas consideradas como fatores de virulência no gênero *Leishmania,* se destacam a glicoproteína GP63, o lipofosfoglicano (LPG) e as cisteíno proteases (CHAUDHURI & CHANG, 1988). Considerando a disponibilidade limitada de tratamento e o baixo investimento em pesquisas sobre a doença, a necessidade de se pesquisar moléculas que podem ser um alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicinas se mostra imperativa no combate a esta patologia negligenciada, que acomete milhões de pessoas ao redor do planeta (ROATT *et al*., 2020).

REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

OBJETIVO

Avaliar a capacidade inibitória de análogos isoxazólicos sobre a atividade enzimática das proteases rCPB2.8 e rCPB3.0 de *Leishmania mexicana*.

METODOLOGIA

O processo foi iniciado com a adição de 1000 µL de tampão acetato de sódio 100 mM, NaCl 50 mM e EDTA de pH 5,5 em cubeta de quartzo previamente inserida no espectrofluorímetro (SHIMADZU RF6000). Após o aquecimento do tampão de triagem, adicionou-se 5 µL da enzima (já disponível para uso por processos anteriores de clonagem e expressão realizados pelos demais alunos do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica) e 3 µL de DTT 1 mM. A solução foi deixada para incubar por 10 minutos a 37 ºC. Passado o tempo estipulado, adicionou-se 5 µL de substrato Z-FR-MCA e iniciou-se a leitura utilizando-se λ_{ex} = 360 nm e λ_{em} = 480 nm, respectivamente, para se obter o valor controle. Em seguida, procedeu-se com a adição dos compostos nas concentrações de 10 µM e 100 µM. Para cada composto, anotou-se os valores obtidos de atividade enzimática nas concentrações adicionadas, os quais foram convertidos em atividade residual e tratados através do programa *Grafit* 5.0.13 (ERITHACUS SOFTWARE). Utilizando as mesmas condições reacionais da triagem, determinou-se o potencial inibitório dos compostos que foram mais efetivos a partir da adição de concentrações crescentes de inibidor e mantendo-se fixos os volumes de substrato e enzima. Para a obtenção dos valores, utilizou-se a equação da regressão não linear. Os dados foram analisados e tratados através do programa *Grafit* 5.0.13 (ERITHACUS SOFTWARE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como evidenciado pela **Tabela 1**, os compostos (divididos em Deia e DR conforme autoria dos responsáveis pela síntese) apresentaram elevados valores de IC_{50} no que se refere à inibição da rCPB2.8, indicando que é necessário um grande volume de composto para promover a inativação parcial da enzima. Nota-se que da classe Deia o composto mais efetivo foi o Deia 3 (IC_{50} = 26,81±1,56 µM) ao passo que o composto menos efetivo foi o Deia 27 (IC_{50} = 172,86±7,92 µM). Quanto aos compostos DR, o DR 19 apresentou a melhor capacidade de inibição (IC_{50} = 82,24±3,38 µM) e o DR 17 mostrou-se o menos efetivo em interferir na atividade da enzima (IC_{50} = 203,81±25,04 µM). É interessante ressaltar, que apesar dessa comparação, todos os compostos apresentaram altos valores de IC_{50}, o que mostra sua pouca influência na inibição da CPB2.8.

REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

Tabela 1: Potencial Inibitório (IC_{50}) dos análogos isoxazólicos Deia e DR sobre a atividade da rCPB2.8

Composto	**IC_{50} (μM)**
Deia 2	41,53 ± 1,75
Deia 3	26,81 ± 1,56
Deia 27	172,86 ± 7,92
Deia 29	115,94 ± 3,88
DR 2	88,93 ± 3,84
DR 5	116,50 ± 4,92
DR 9	175,31 ± 6,93
DR 17	203,81 ± 25,04
DR 18	158,86 ± 6,59
DR 19	82,24 ± 3,38
DR 21	112,09 ± 4,78

Fonte: Arquivo pessoal

Diferentemente do observado com a rCPB2.8, os compostos apresentaram baixos valores de IC_{50} na inibição da rCPB3.0 (**Tabela 2**), havendo destaque para Deia 8 (IC_{50} =3,20±0,24 μM), Deia 29 (IC_{50} =4,82±0,49 μM), DR 17 (IC_{50} =2,21±0,26 μM) e DR 21 (IC_{50} =3,42±0,60 μM). É possível observar, ainda, que os compostos Deia 5,10, 12 e 27 foram os menos efetivos, apresentando valores de IC_{50} acima de 40 μM - uma grande variação em relação à média geral de todos os compostos.

REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

Tabela 2: Potencial Inibitório (IC_{50}) dos análogos isoxazólicos Deia e DR sobre a atividade da rCPB3.0.

Composto	IC_{50} (µM)
Deia 3	12,41 ± 1,01
Deia 4	6,91 ± 0,69
Deia 5	52,65 ± 2,79
Deia 8	3,20 ± 0,24
Deia 10	56,79 ± 1,63
Deia 11	21,29 ± 1,62
Deia 12	41,43 ± 4,35
Deia 27	44,82 ± 1,19
Deia 29	4,82 ± 0,49
DR 5	7,13 ± 0,81
DR 11	8,57 ± 0,92
DR 13	10,43 ± 0,51
DR 17	2,21 ± 0,26
DR 18	5,33 ± 0,67
DR 19	9,50 ± 0,99
DR 21	3,42 ± 0,60

Fonte: Arquivo pessoal

Ainda de acordo com os dados da Tabela 2, os baixos valores de IC_{50} obtidos com a rCPB3.0 indicam que os compostos possuem capacidade de interferir na ligação dessa protease com seu substrato. Isso pode estar relacionado com a substituição de ácido aspártico por serina que existe no resíduo 64 da rCPB3.0, o que deve ter influência na ligação do inibidor no sítio ativo (JUDICE *et al*., 2005). O composto DR 17 (IC_{50} = 2,21±0,26 µM) indubitavelmente foi o mais efetivo para inibir a rCPB 3.0, ainda que curiosamente não tenha uma boa atividade na inibição da rCPB2.8 (na qual apresentou um IC_{50} de 203,81±25,04 µM). Na sua estrutura, o composto DR 17 apresenta um núcleo isoxazólico acoplado a um arcabouço de nitrofurano e a um radical butil (TREFZGER *et al*., 2019). As atividades de isoxazóis e de grupos nitro contra parasitas são bastante elucidadas na literatura. Neves *et al*., (2019) já determinou que existe uma ótima atividade leishmanicida de análogos isoxazólicos modificados contra formas amastigotas e promastigotas do parasita, porém a modificação específica presente no composto DR 17 levanta hipóteses acerca de como essa estrutura química interage com

a enzima. A adição do radical butil à estrutura do núcleo isoxazólico, juntamente ao nitrofurano (adição não está presente nos demais compostos DR) parece ter um caráter incremental à inibição pelo composto. Estudos de síntese de inibidores de cruzaína realizados por Avelar (2014) apontam que a presença do radical butil influência nas interações moleculares com os aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima. Nesse sentido, uma abordagem interessante seria realizar mais ensaios de potencial inibitório com outros análogos isoxazólicos que possuem o grupo butil na sua estrutura. Por outro lado, espera-se que um inibidor seja efetivo contra mais de uma isoforma da enzima, o que não parece ser o caso desses análogos frente às atividades das rCPBs 2.8 e rCPB3.0. Sabe-se que para o desenvolvimento de fármacos cisteino-protease específicos, é necessário que o inibidor enzimático tenha um amplo espectro de ação. Dessa forma, é imperativo que se dê continuidade ao estudo, analisando a inibição da isoforma rH84Y para determinar se os compostos possuem a capacidade de inibir substancialmente mais de um isoforma com baixos valores de IC50. Com isso, será possível prosseguir com ensaios de mecanismo de inibição para uma avaliação completa da cinética enzimática.

CONCLUSÕES

Os análogos isoxazólicos avaliados neste estudo tiveram a capacidade de inibir as cisteíno proteases rCPB2.8 e rCPB3.0, porém com ressalvas no que se refere à isorforma rCPB2.8, que apresentou altos valores de IC_{50}. Os compostos DR e Deia foram bastante efetivos ao inibir a atividade da rCPB3.0, principalmente o composto DR 17, cuja estrutura apresenta um radical butil que parece estar envolvido na interação com o sítio ativo da enzima. Para determinar de forma indubitável a influência desses compostos nas CPBs, é necessário que se dê continuidade ao estudo avaliando-se outras isoformas, uma vez que um candidato a fármaco efetivo para o tratamento das leishmanioses deve ter um grande espectro de ação.

REFERÊNCIAS

AVELAR, Leandro Antonio Alves. Síntese de inibidores das enzimas cruzaína e diidroorotato desidrogenase de Trypanosoma cruzi. 2014. 211 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

AZEVEDO, Roberta Carvalho de Freitas; MARCILI, Arlei. Alterações cutâneas secundárias à infecção por leishmania sp.: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19328-19346, abr. 2020.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K.P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania mexicana promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 43-52, Jan. 1988.

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

NEVES, R.; TREFZGER, O.; BARBOSA, N.; HONORATO, A.; CARVALHO D.; MOSLAVES, I.; KADRI, M.; YOSHIDA, N.; KATO, M.; ARRUDA, C. Effect of isoxazole derivatives of tetrahydrofuran neolignans on intracellular amastigotes of Leishmania (Leishmania) amazonensis: A structure–activity relationship comparative study with triazole-neolignan-based compounds. **Chem Biol Drug Des**, 2019.

REY, Luís. **Parasitologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

ROATT, Bruno Mendes *et al*. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, nov. 2020.

TREFZGER, O.; BARBOSA , N.; SCAPOLATEMPO, R.; NEVES, A.; ORTALE, M.; CARVALHO, D.; HONORATO, A.; FRAGOSO, M.; SHUIGUEMOTO, C.; PERDOMO, R.; MATOS, M.; CHANG, M.; ARRUDA, C.; BARONI, A. Design, synthesis, antileishmanial, and antifungal biological evaluation of novel 3,5-disubstituted isoxazole compounds based on 5-nitrofuran scaffolds. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 353, n. 2, dez. 2019.