

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DE CISTEÍNO- PROTEASES DE PARASITAS DO GÊNERO LEISHMANIA POR COMPOSTOS CICLOPALADADOS

Jonathan Nicolau da Silva¹; Adelino Vieira de Godoy Netto²; Gabriela Francini Bozza Ricci³;
Camila Gracielle Dellatorre Padovani⁴; Wagner Alves de Souza Júdice⁵

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: jonathanicolau@hotmail.com
2. Professor UNESP-Araraquara; e-mail: adelino@iq.unesp.br
3. Estudante de Química da UNESP-Araraquara; e-mail: gabrielafrancini@gmail.com
4. Mestre em Biotecnologia; e-mail: camipadovani@yahoo.com.br
5. Professor da Universidade Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br

Área de conhecimento: **Enzimologia**

Palavras-chaves: Mecanismo; leishmaniose; paládio; cisteíno-proteases.

INTRODUÇÃO

Leishmaniose é uma doença parasitária que acomete principalmente países tropicais, causada por parasitos do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares que se hospedam em células do Sistema Fagocitário Mononuclear de mamíferos, possuindo duas formas em seu ciclo de vida (amastigota e promastigota), possuindo hospedeiros intermediários artrópodes Flebotomíneos, que transmitem os parasitos por meio de hematofagia (CARVALHO, DIAS, RANGEL, 2014). Para que estes parasitos possam sobreviver e se reproduzirem dentro de fagócitos eles se utilizam de certos mecanismos, e um deles é a utilização de enzimas proteolíticas como as cisteíno-proteases B de *Leishmania*, que possui função de camuflar o parasito diminuindo a resposta imune celular e aumentando a resposta imune humoral (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Por conta de não possuir tratamento bem estabelecido, novas formas de combate à doença estão sendo testados, como a utilização de novos compostos capazes de neutralizar mecanismos de defesa dos parasitos, sendo um destes compostos os derivados de paládio, sendo descritos como potenciais antiparasitários, antimicrobianos e antitumorais, agindo em proteases relacionadas a estas doenças (BARRA *et al.*, 2016).

OBJETIVO

Realizar testes a fim de esclarecer por qual mecanismo os compostos derivados de paládio testados inibem as enzimas recombinantes rCPB 2.8, 3.0 e rH84Y de *Leishmania mexicana*.

METODOLOGIA

Para realização dos testes de mecanismo de inibição foi necessária expressão e purificação das enzimas recombinantes rCPB 3.0 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, onde o gene de cada enzima foi inserido em plasmídeo pQe30. O plasmídeo foi então inserido na bactéria *Escherichia coli* para expressão em 700 mL de meio de cultura com adição de indutor de expressão IPTG. A purificação foi realizada em coluna de níquel por cromatografia de afinidade. Os mecanismos de inibição foram realizados utilizando os compostos de paládio GAFOX 5, GAFOX 6, CBZOX 5 e CBZOX 6 previamente testados, realizando curvas de Michaelis-Menten com crescentes concentrações dos compostos, e com isso os plots de inclinação (1/V em função de 1/S) e

replots de inclinação determinando a constante de dissociação do complexo enzima-substrato, e então analisando como o composto interage com a enzima.

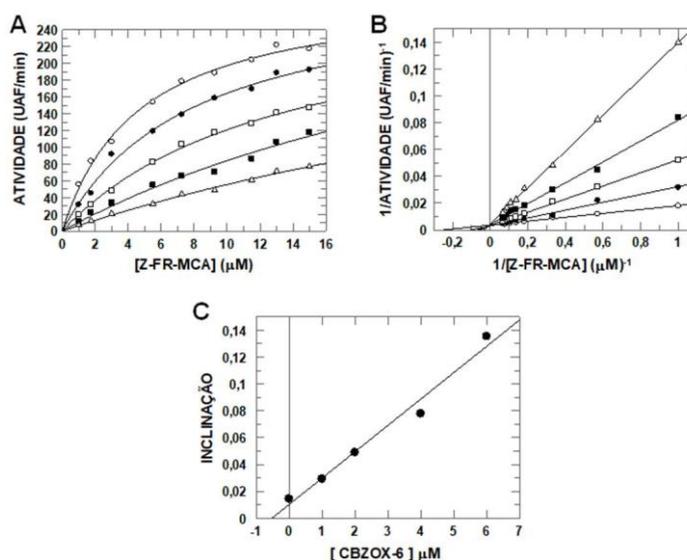
RESULTADOS/DISCUSSÃO

Após seleção dos compostos com maior potencial inibitório, ou seja, melhores valores de IC₅₀ (Tabela 1) foram realizados os testes de mecanismo de inibição, onde em todos os testes realizados foi constatado que todos os compostos inibem as enzimas recombinantes de *Leishmania* de maneira competitiva. Isso pode ser visualizado a partir do plote dos inversos (Lineweaver-Burk) onde todas as retas se interseccionam no eixo Y (Figura 1) (COPELAND, 2013; MARANGONI, 2003). A partir do replote de inclinação foi possível adquirir o valor de K_i para cada teste realizado (Tabela 2) onde se percebe que em sua maioria os valores são menores que 2,5 uM, demonstrando alta afinidade dos compostos de paládio pelas CPB's.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ dos compostos utilizados para realização dos testes de mecanismos de inibição.

ENZIMA	IC ₅₀ (uM)			
	GAFOX 5	GAFOX 6	CBZOX 5	CBZOX 6
rCPB 2.8	3,38 ± 0,13	4,90 ± 0,44	4,50 ± 0,36	4,92 ± 0,13
rCPB 3.0	20,12 ± 1,20	10,02 ± 0,5	7,27 ± 0,47	6,6 ± 0,3
rH84Y	7,58 ± 0,37	4,88 ± 0,56	3,08 ± 0,20	3,62 ± 0,28

Figura 1: Mecanismo de inibição do composto CBZOX 5 na enzima rCPB 3.0.



Legenda: A) plote de Michaelis-Menten; B) plote dos inversos (Lineweaver-Burk); C) replote da inclinação. ○ → controle; ● → 1uM; □ → 2uM; ■ → 4uM; △ → 6uM.

Tabela 2: Valores de Ki para os testes de mecanismo de inibição dos compostos de paládio.

	rCPB 2.8	rCPB 3.0	rH84Y
GAFOX 5	2,19 ± 0,11 uM	-	-
GAFOX 6	2,01 ± 0,12 uM	13,1 ± 1,2 uM	0,29 ± 0,02 uM
CBZOX 5	0,65 ± 0,04 uM	-	-
CBZOX 6	4,46 ± 0,23 uM	0,52 ± 0,04 uM	1,25 ± 0,08 uM

CONCLUSÕES

Conclui-se que a partir dos testes realizados, os compostos GAFOX 5 e 6 e CBZOX 5 e 6 possuem alto potencial de inibição das enzimas recombinantes de *Leishmania*, possuindo valor de Ki menores que 2 uM em sua maioria, porém alguns testes necessitam ser realizados para melhor compreensão dos resultados. Além disso, todos os mecanismos de inibição são do tipo competitivo. Os baixos valores de Ki fazem dessa classe de compostos potenciais moléculas para desenvolvimento de drogas leishmanicidas.

REFERÊNCIAS

- BARRA, C.V.; F.V. ROCHA; MOREL, L.; GAUTIER, A.; GARRIDO, S.S.; MAURO, A.E.; FREM, R.C.G.; NETTO, A.V.G. DNA binding, topoisomerase inhibition and cytotoxicity of palladium(II) complexes with 1,10- phenanthroline and thioureas. **Inorganica Chimica Acta**, vol 446p. 54-60, 2016.
- CARVALHO, BRUNO MOREIRA; DIAS, CRISTINA MARIA GIORDANO; RANGEL, ELIZABETH FERREIRA. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Rio de Janeiro State, Brazil: species distribution and potential vectors of leishmaniasis. **Rev. Bras. entomol.**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 77-87, Mar. 2014.
- COPELAND, R. A.. **Evaluation of Enzyme Inhibitors In Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists**. 2^a ed. John Wiley & Sons, 2013.
- MARANGONI, A.G.. **Enzyme Kinetics: a modern approach**. 1^a ed. John Wiley & Sons, 2003.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J.. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current opinion in microbiology**, vol. 7, p. 375-381, 2004.