



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



## AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE VANILINA-MORFOLINA- ETILTIOSSEMICARBAZONA E COMPLEXO DE PALÁDIO COMO POTENCIAIS INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES DE *Leishmania mexicana*

Ivy Naomi Komai<sup>1</sup>, Luan dos Santos Vianna<sup>2</sup>, Wagner Alves de Souza Júdice<sup>3</sup>

1. Estudante - curso de Farmácia; e-mail: ivy.naomi@gmail.com;
2. Doutorando em Biotecnologia - UMC; e-mail: luan.quimica25@gmail.com;
3. Professor – UMC; e-mail: wagnerjudice@gmail.com.

**Área de conhecimento:** Enzimologia.

**Palavras-chave:** leishmania mexicana, cisteíno proteases, tiossemicarbazona, paládio.

### INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão presentes há anos nas listas das doenças negligenciadas. Originam formas clínicas graves que levam à mutilação, invalidez e morte, e sua gravidade e distribuição geográfica as tornam um problema de saúde pública que, apesar das estratégias de prevenção e controle, ainda são um desafio (OPAS, 2019). Os fármacos de referência empregados no tratamento apresentam uma série de efeitos adversos indesejáveis, como elevada cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, sendo contraindicado para vários grupos de risco e, portanto, estão longe de atender as necessidades de populações endêmicas (VELTRI, 2019). No desenvolvimento de novos compostos inibidores de cisteíno-proteases, aqueles à base de metais de transição despertaram grande interesse, em destaque os de metais pertencentes ao grupo da platina, pois são menos tóxicos e podem possuir um espectro mais amplo de atividade. O paládio, representante deste grupo, é um forte candidato na concepção de novas drogas organometálicas antitumorais e também antiparasitárias atualmente. As tiossemicarbazonas são uma classe de moléculas que apresentam grande versatilidade farmacológica, tais como atividade antiviral, antibacteriana, antitumoral, bem como por sua ação parasiticida contra *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (TENÓRIO *et al.*, 2005, GREENBAUM, 2004). Sua habilidade para formar complexos organometálicos confere a propriedade de agente quelante, despertando muito interesse nessa classe para síntese de novas moléculas (BERALDO *et al.*, 2004). As cisteíno proteases são a classe de proteínas mais relatadas em atividades virulentas nas espécies de *Leishmania*, sendo notório que há uma correlação direta entre os níveis de expressão de cisteíno proteases (CPs) e a infecciosidade dos parasitas. A CPB tem sido apontada como a CP mais relevante para a espécie de parasitas *Leishmania mexicana*. Formas recombinantes das CPs, como a rCPB2.8, a rCPB3.0 e sua forma mutante rH84Y, tem sido muito utilizada no estudo da especificidade de seu substrato. Judice *et al.*, 2005 demonstraram que as pequenas variações de aminoácidos em suas composições afetam diretamente sua especificidade. A alta toxicidade, o custo e prejuízos causados ao hospedeiro, mostram que as terapias disponíveis estão longe de atender as necessidades de populações endêmicas (VELTRI, 2019).



## OBJETIVO

Avaliar e caracterizar compostos derivados de vanilina-morfolina-etil-tiossemicarbazona e complexo de paládio, como possíveis inibidores de cisteíno proteases de *Leishmania mexicana* rCPB2.8 e rCPB3.0.

## METODOLOGIA

As enzimas rCPB2.8 e rCPB3.0 foram expressas no Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica da Universidade de Mogi das Cruzes (CIIB/UMC). Foram avaliados 5 compostos (cedidos pelo Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, UNESP-ARARAQUARA), sendo 2 complexos de paládio, um composto de complexo de ouro, 2 compostos vanilina-tiossemicarbazona sem ligante metálico. Compostos J1, M1, L1 e L2 apresentam o ligante 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona (vanilina tiossemicarbazona). Potencial inibitório IC<sub>50</sub> foi determinado por regressão não-linear utilizando como sonda fluorogênico o substrato Cbz-FR-MCA em espectrofluorímetro HITACHI-F2500. Os dados obtidos foram tratados no software *Grafit* 5.0 configurado para cálculo de regressão não-linear, e forneceu os valores de IC<sub>50</sub> para os compostos testados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral os compostos apresentaram maior efetividade inibitória da rCPB2.8, comparativamente à inibição da rCPB3.0 (TABELA 1). Os resíduos de aminoácidos 60, 61 e 64 estão localizados em um  $\alpha$ -hélice que forma a parede do sítio catalítico (JULIANO *et al.*, 2004). A rCPB2.8 possui os resíduos Asn60, Asp61 e Asp64; já a rCPB3, contém Asp60, Asn61 e Ser64. As alterações existentes entre eles acabam resultando em modificações no ambiente eletrostático que deve ser responsável pelas variações na atividade das CPBs (STOKA *et al.*, 1998).

**Tabela 1** – Potencial inibitório (IC<sub>50</sub>) dos compostos sobre a rCPB2.8 e rCPB3.

Composto	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
	rCPB2.8	rCPB3.0
WB	8,16 $\pm$ 0,9	16,76 $\pm$ 0,74
L1	7,55 $\pm$ 0,5	78,51 $\pm$ 14,41
L2	17,56 $\pm$ 1,1	323 $\pm$ 139
M1	6,27 $\pm$ 0,6	232 $\pm$ 91
J1	4,86 $\pm$ 0,3	-----

O composto J1, que contém paládio em sua estrutura, apresentou comportamento de ativação da enzima rCPB3.0, portanto, não foi possível realizar a determinação de seu potencial inibitório. Por outro lado, foi o composto com melhor potencial inibitório (IC<sub>50</sub>=4,86 $\pm$ 0,36  $\mu$ M) sobre a rCPB2.8 (TABELA 1). Ele apresenta o grupo trifenilfosfina ligado ao paládio. A trifenilfosfina aumenta a lipofilicidade dos complexos, estabelece fortes ligações com Pd(II) e apresenta a capacidade de ocupar bolsões hidrofóbicos nos sítios de várias enzimas (QUEIROZ E BATISTA, 1998; GUNATILLEKE e BARRIOS, 2008). Nesse sentido, cisteíno proteases de parasitos apresentam o subsítio S2 com



## REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



caráter hidrofóbico o qual poderia ser local de interação do grupo trifenilfosfina. Por sua vez, 4-fenil-tiossemicarbazona fornece aos complexos maior estabilidade termodinâmica (ROCHA, 2013). O composto L2 se mostrou o menos reativo frente às duas enzimas, apresentando os maiores valores de IC<sub>50</sub>. O composto L2 possui ligante piperidina ao invés de uma morfolina, o que poderia justificar a menor atividade inibitória. Podemos especular que o oxigênio do anel morfolínico favorece interação com a rCPB3.0, pois sua substituição pelo anel piperidínico aumentou o valor de IC<sub>50</sub> na inibição da rCPB2.8 e rCPB3.0. Morfolina pode ser o principal ligante em compostos com potencial leishmanicida em função da presença do nitrogênio no anel (KHAN *et al.* 2009). Compostos derivados da tiossemicarbazonas se mostraram ativos contra tripanossomídeos, ou seja, leishmanicidas (BRITTA *et al.*, 2014). Apesar do mecanismo de ação dessa classe de molécula não ser exatamente entendido, supõem que componentes intracelulares podem ser alvos de sua especificidade estrutural. Tiossemicarbazonas são drogas promissoras no combate de vários protozoários parasitas, atuando através da inibição de cisteíno proteases (GREENBAUM *et al.* 2004). O composto WB apresenta o ligante 2,6-dimetilpiperidina e foi o mais efetivo na inibição das enzimas rCPB2.8 e rCPB3.com valores de IC<sub>50</sub> de 8,16uM e 16,76uM, respectivamente.

## CONCLUSÃO

Compostos Tiossemicarbazonas contendo metal são uma fonte promissora no desenvolvimento de moléculas inibidoras de cisteíno proteases de tripanossomatídeos. Contudo, uma vez que os protozoários dessa família apresentam uma gama de cisteíno proteases envolvidas na patogenicidade bem como auxiliado no mecanismo de escape em função de presença de diferentes isoenzimas, o desenvolvimento de uma molécula deverá levar em consideração a possibilidade de inibição de um grande número dessas cisteíno proteases de parasitas para efetiva ação tripanocida. Assim sendo, o composto WB poderia ser assumido como molécula líder para futuras modificações visando aumentar seu potencial inibitório.

## REFERÊNCIAS

BERALDO, Heloisa *et al.* Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 461-471, junho 2004.

BRITTA, E. A. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 14, p. 236, setembro 2014.

GREENBAUM, Doron C. *et al.* Synthesis and Structure–Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 47, ed. 12, p. 2945-3328, May 2004.

GUNATILLEKE, S. S.; BARRIOS, A. M. Tuning the Au(I)-mediated inhibition of cathepsin B through ligand substitutions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 555-563, 2008.



## REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



JUDICE, Wagner A. S. *et al.* Specific negative charges in cysteine protease isoforms of *Leishmania mexicana* are highly influential on the substrate binding and hydrolysis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], ano 2005, v. 144, n. 1, p. 36-43, 1 nov. 2005.

JULIANO MA, BROOKS DR, SELZER PM, *et al.* Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. *Eur J Biochem* 2004; 271:3704–14.

KHAN, K. M. *et al.* Leishmanicidal potential of N-substituted morpholine derivatives: synthesis and structure-activity relationships. *Natural product research*, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 479–484, 2009.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019 Disponível em: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis).

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina. **Química Nova**, v. 19, p. 651-659, 1996.

ROCHA, FV. Síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral de complexos de paládio(ii) com ligantes sulfurados e trifenilfosfina. Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. 2013.

STOKA V, MCKERROW JH, CAZZULO JJ, TURK V. Substrate inhibition of cruzipain is not affected by the C-terminal domain. *FEBS Lett* 1998; 429:129–33

TENÓRIO, Rômulo P. *et al.* Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 12 dez. 2005.

VELTRI, Eduardo Raul Pereira. Desenvolvimento de uma estratégia para a prospecção de fármacos inibidores da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) de *Leishmania* spp. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019