

AVALIAÇÃO DE CICLOPALADADOS NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE CISTEÍNO PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Jonathan Nicolau da Silva¹; Camila Gracielle Dellatorre Padovani²; Adelino Vieira de Godoy Netto³; Gabriela Francini Bozza Ricci⁴; Débora Martins de Andrade⁵; Wagner Alves de Souza Júdice⁶

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

Área de conhecimento: **Enzimologia**

Palavras-Chave: Paládio; Cisteíno-proteases; Leishmania.

INTRODUÇÃO

Leishmaniose é uma doença causada por parasitas do gênero leishmania, intracelulares, que se instalam em células do sistema fagocitário mononuclear. Esses parasitas infectam mamíferos como cães e seres humanos por intermédio de artrópodes dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, os insetos vetores, quando os mesmos realizam hematofagia em mamíferos (REY, 2010). Por infectarem células que deveriam eliminá-los, eles necessitam de mecanismos para burlar o sistema imune do hospedeiro, sobreviver e se multiplicar, e um desses mecanismos se dão por meio de cisteíno-proteases, ou CPB's, que agem "ativando" o sistema imune humoral e "desativando" o sistema imune celular da célula fagocitária, se camuflando (HANDMAN, BULLEN, 2002; SILVA-LOPEZ, 2010). Por conta disso, alguns compostos estão sendo testados a fim de inibir a ação dessas enzimas, como o paládio. O paládio é um composto descrito como tendo ação antibacteriana e principalmente antitumoral, porém, por ser um elemento tóxico, compostos derivados deste elemento estão sendo desenvolvidos e testados para tornar-se novos fármacos (BARRA et al, 2016; de MOURA et al, 2017).

OBJETIVOS

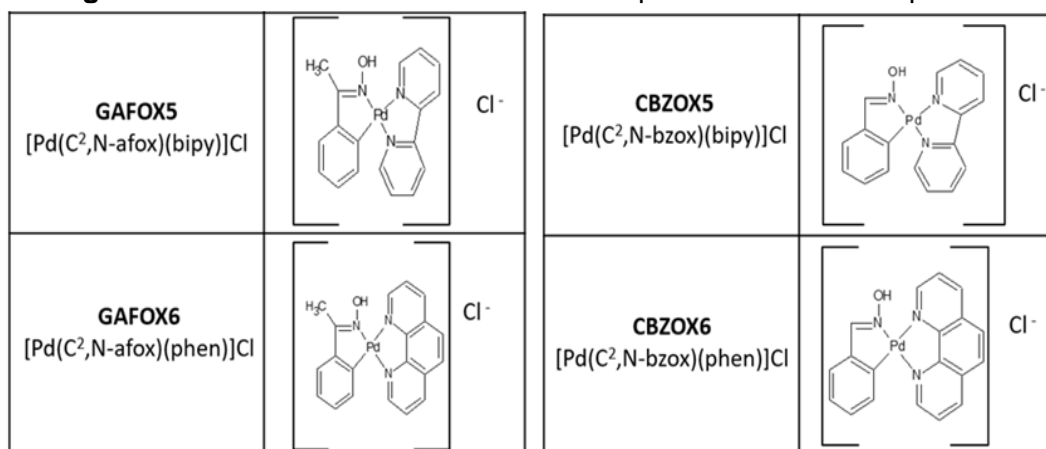
Analisar compostos derivados de paládio a fim de estabelecer uma possível ação inibitória das cisteíno-proteases de tripanossomatídeos rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y.

METODOLOGIA

Realizou-se testes de IC₅₀, avaliação da concentração mínima de composto capaz de diminuir a atividade enzimática em 50%, utilizando tampão acetato de sódio 100mM, triton X-100 a 0,01%, EDTA 5mM, glicerol 20%, pH 5,5, adicionando o redutor Ditiotreitól (DTT) 1M, o substrato fluorescente Z-FR-MCA 9μM e a enzima a ser testada em temperatura de 37°C. Os testes foram realizados por espectrofluorimetria em λ_{Ex}=360nm e λ_{Em}=480nm de comprimentos de onda, onde os dados foram tratados no programa Grafit 5.0. Os compostos utilizados foram os derivados de paládio GAFOX 5 e 6, e CBZOX 5 e 6, cedidos pelo Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto do Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP Araraquara (Figura 1).

Para sequência dos testes a enzima rCPB2.8 foi expressa por intermédio de clone cedido Prof. Dr. Jeremy C. Mottram, do Centro de Imunologia e Infecção, do Departamento de Biologia da Universidade de York, Reino Unido. O plasmídeo foi retirado das cepas clonadas recebidas por meio de minipreparação plasmidial (Miniprep), e então inseridas em cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) por transformação, realizada por choque térmico. A expressão foi realizada em volume de 700mL de meio LB Broth com a bactéria transformada, e após isso, as células foram lisadas e as enzimas então retiradas e purificadas por meio de cromatografia em coluna de níquel.

Figura 1: Nomenclatura e estrutura dos compostos derivados de paládio.



RESULTADOS/DISCUSSÃO

Com os testes realizados, foram obtidos valores de IC₅₀ (Tabela 1), e com esses valores foi possível perceber certa resistência da enzima rCPB 3.0 em relação aos compostos de paládio, possuindo valores de IC₅₀ maiores do que os realizados com a rCPB 2.8 e rH84Y. Ao mesmo tempo, a enzima rCPB 2.8 se mostrou mais sensível, possuindo valores menores, sendo a menor deles para o composto GAFOX 5, enquanto que para a rH84Y os compostos mais relevantes foram os CBZOX 5 e 6. Analisando os resultados percebe-se uma diferença em relação a como cada composto reage a cada enzima, sendo que cada composto foi mais efetivo em uma isoforma do que em outra, e isso pode ser explicado por conta de diferenças que as moléculas possuem, em relação às diferenças estruturais e de aminoácidos das enzimas, como a troca de uma Histidina por uma Tirosina na posição 84, e os aminoácidos das posições 60, 61 e 64 (JUDICE et al., 2005). As diferenças apresentadas podem indicar uma possível interação das moléculas com o sítio alostérico da enzima, pela distância que os aminoácidos citados têm do sítio catalítico. Em comparação a outros compostos derivados de paládio (DPPE 1.2 e 1.2) (DOS SANTOS et al., 2018; PALADI, 2012), os compostos deste estudo tiveram uma eficiência 1000 vezes menor, porém, o DPPE possui ligantes que tornam a molécula mais eletronegativa, o que pode estar interferindo na atividade enzimática (JUDICE et al., 2005). Já em comparação com Fricker et al. (2008), que utilizou um composto derivado de paládio obtendo um valor de 2,1uM, valor 1uM menor do que os compostos de nosso estudo, mas comparando as moléculas, a molécula de Fricker et al. (2008) também era mais eletronegativa, possuindo enxofre e carbonila.

Tabela 1: Resultados de IC₅₀ para os compostos de paládio testados, em µM.

ENZIMA	IC ₅₀ (µM)			
	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

CONCLUSÕES

Conclui-se então que os compostos de paládio possuem boa inibição das cisteíno-proteases recombinantes de *Leishmania mexicana*, sendo os compostos CBZOX os mais eficientes, tendo a rCPB 2.8 como a mais sensível e a rCPB 3.0 como a mais resistente aos compostos. Essas diferenças entre a inibição das enzimas pelos compostos se deve a diferença de aminoácidos entre as isoformas e as diferenças entre os ligantes dos compostos.

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*, 446: 54-60, 2016.

DOS SANTOS I.B., DA SILVA D.A.M., PAZ F.A.C.R., GARCIA D.M., CARMONA A.K., TEIXEIRA D., LONGO-MAUGÉRI I.M., KATZ S., BARBIÉRI C.L. Leishmanicidal and Immunomodulatory Activities of the Palladacycle Complex DPPE 1.1, a Potential Candidate for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Front Microbiol.* 9:1427, 2018.

FRICKER S.P., MOSI R.M., CAMERON B.R., BAIRD I., ZHU Y., ANASTASSOV V., COX J., DOYLE P.S., HANSELL E., LAU G., LANGILLE J., OLSEN M., QIN L., SKERLJ R., WONG R.S., SANTUCCI Z., MCKERROW J.H. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. *J Inorg Biochem*, volume 102 (10): 1839-1845, 2008.

HANDMAN E. & BULLEN D.V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18(8):332-334, 2002.

JUDICE, W. A.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. ; 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 (Print)*, 144(1), 36-43, 2005.

de MOURA, T.R., CAVALCANTI, S.L., DE GODOY, P.R.D.V. ET AL. Synthesis, characterization and antitumor activity of palladium(II) complexes of imidazolidine-2-thione. *Transit Met Chem*, 42: 565, and 2017.

PALADI C. DE S., PIMENTEL I.A., KATZ S., CUNHA R.L., JUDICE W.A., CAIRES A.C., BARBIÉRI C.L. In vitro and in vivo activity of a palladacycle complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. PLoS Negl Trop Dis. 6(5): e1626, 2012.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 37 a 74.

SILVA-LOPEZ, RAQUEL ELISA DA. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. Quím. Nova, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.