

Resumo do Trabalho em português:



Inibição da atividade proteolítica e viabilidade em *Leishmania* spp.

F. L. Ribeiro, J. C. J. Quilles, A. Leitão

NEQUIMED – Grupo de Química Medicinal, IQSC/USP | e-mail: felenita.ribeiro@gmail.com

Objetivos

Quantificação da atividade proteolítica de protozoários do gênero *Leishmania* spp. a partir de ensaios celulares com substâncias bioativas na inibição de cisteína proteases e sua relação com a atividade citotóxica.

Métodos e Procedimentos

Estudos colorimétricos e fluorimétricos foram realizados em paralelo para determinar a relação entre atividade proteolítica e viabilidade celular em espécies de *Leishmania* (*L.*) spp. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico MTT e a atividade proteolítica pela hidrólise do substrato fluorogênico seletivo para cisteína proteases Z-FR-MCA [1]. Olanacatib (inibidor de catepsina K), E64 (inibidor irreversível de cisteína proteases) e Neq0571 (inibidor de CPB) foram usados como inibidores da atividade de cisteína proteases. Anfotericina B foi o controle positivo para o ensaio citotóxico.

Resultados

As curvas de padronização obtidas para as espécies de *Leishmania* spp. evidenciaram o diferente nível de expressão de cisteína proteases. A presença de 10 μ M de Z-FR-MCA foi adequada para a *L. chagasi*, enquanto que a concentração do substrato fluorogênico para *L. amazonensis* foi aumentada para 20 μ M devido a sua saturação na concentração inicial (dados não mostrados). Isto demonstra que *L. amazonensis* possui maior metabolismo do substrato em relação a *L. chagasi*. Diferentes inibidores de cisteína proteases foram testados, mas foram inativos (Figura 1). A anfotericina B reduziu drasticamente a viabilidade celular do protozoário e ocasionou um aumento no sinal de fluorescência do substrato. A partir da curva concentração-resposta utilizando ambos os métodos (MTT e substrato fluorogênico) foram obtidos valores de IC_{50} muito próximos (Figura 2). A atividade citotóxica da anfotericina B parece estar diretamente relacionada à desestabilização

da membrana, com liberação ou ativação de cisteína proteases.

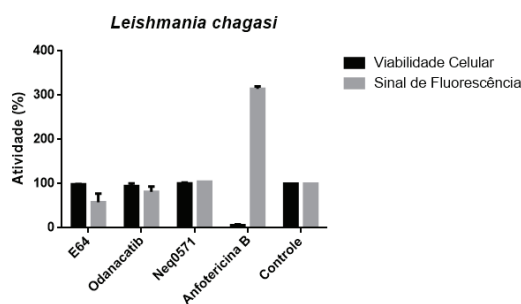


Figura 1: Viabilidade celular e metabolismo de substrato para promastigotas de *L. chagasi* pós 72 h, utilizando anfotericina B como composto referência (1 μ M) e Neq0571 (100 μ M).

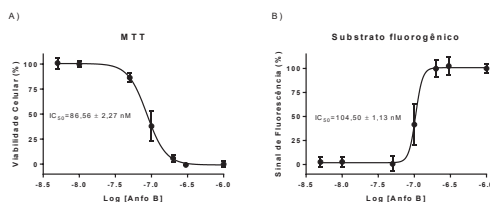


Figura 2: Curvas de concentração-resposta para anfotericina B incubada por 24h com promastigotas de *L. chagasi* obtidas por (A) método colorimétrico e (B) método fluorimétrico.

Conclusões

Os inibidores de cisteína proteases usados não apresentaram atividade significativa nos ensaios, o que é algo inesperado de acordo com a literatura [1] e será estudado em ensaios posteriores. A permeação da membrana celular promovida pela anfotericina B está relacionada com o aumento da hidrólise do substrato fluorogênico, o que pode estar associado à liberação/ativação de enzimas proteolíticas decorrente do processo de morte celular.

Referência Bibliográfica

Caroselli, E. et al. *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* peptidase activities inside the living cells and in their lysates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 184, n. 2, p. 82-89, 2012.