

NTPDase 1 de *Leishmania braziliensis* como um alvo terapêutico:¹

estudos dos mecanismos pelos quais os ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos são antileishmaniais

Leishmania braziliensis NTPDase 1 as therapeutic target:
studies of the leishmanicidal mechanisms of alkylaminoalkanethiosulfuric acids

Gabriane Nascimento Porcino²

Ana Carolina Ribeiro Gomes Maia²

Leonardo Ramos Quellis²

Wagner Faria Messias³

Nayara Braga Emídio³

Danielle Gomes Marconato³

Luciana Maria Ribeiro Antinarelli²

Priscila de Faria Pinto⁴

Marcos José Marques⁵

Elaine Soares Coimbra⁶

Eveline Gomes Vasconcelos⁷

DOI: <https://doi.org/10.34019/2179-3700.2019.v19.29888>

Resumo

A proteína nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase 1) de *Leishmania*(*Viannia*) *braziliensis* (Lb) foi recentemente identificada como antigênica e está presente em formas promastigota e amastigota deste protozoário, sendo um possível alvo de drogas. Compostos pertencentes à série dos ácidos N-alquilaminoalcanotiosulfúricos (AAATs), de baixa toxicidade para mamíferos, foram caracterizados como novos antileishmaniais. O estudo de seus modos de ação foi iniciado, e neste trabalho os efeitos de AAATs sobre a atividade fosfohidrolítica da preparação de promastigotas são demonstrados. O ácido 2-(sec-butilamino)-1-octanotiosulfúrico (SSEC) inibe significativamente as atividades ATPásica e ADPásica da preparação de promastigotas (Ki 10-1000 µM), enquanto o ácido 1-(terc-butilamino)-2-etanotiosulfúrico (TBSO) foi menos efetivo. Adicionalmente, estudos preditivos de carga líquida do SSEC em função do pH foram efetuados e, em uma variação de pH de 1 a 8, o estado de ionização deste composto é

¹ Trabalho premiado no Seminário de Iniciação Científica da UFJF em 2016.

² Bolsista PROQUALI/UFJF, FAPEMIG ou CAPES/REUNI.

³ Bolsista BIC/UFJF.

⁴ Professora orientadora do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF.

⁵ Departamento de Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UNIFAL, Alfenas.

⁶ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF.

⁷ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

identicamente mantido. A lipofilia do SSEC conferida pela cadeia carbônica, associada à carga positiva conferida pelo grupo amino, sugere a translocação do composto através de membranas atuando em organelas intracelulares, bem como interagindo com o parasito. A NTPDase 1 pode ser apontada como um novo alvo terapêutico e o SSEC poderá ser explorado em novos protocolos experimentais de leishmanioses.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. NTPDase. Compostos antileishmaniais. Ácidos N-alkylaminoalkanethiosulfúricos.

Abstract

The antigenic nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase 1) was recently identified in *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Lb), and it is present in promastigote and amastigote forms of this protozoan, being a possible drug target. Compounds belonging to the series of N-alkylaminoalkanethiosulfuric acids (AAATs), of low toxicity to mammals, were characterized as novel antileishmanial compounds. The study of its mechanisms of action was initiated, and in this work the effects of AAATs on the phosphohydrolytic activity of promastigotes preparation are demonstrated. The 2-(sec-butylamino)-1-octanethiosulfuric acid (SSEC) significantly inhibits ATPase and ADPase activities of the promastigotes preparation (Ki 10-1000 µM), while 1-(tert-butylamino)-2-ethanethiosulfuric acid (TBSO) was less effective. In addition, predictive studies of SSEC liquid charge as a function of pH were carried out and, at a pH range 1 to 8 ionization state of this compound is identically maintained. The SSEC lipophilicity of the carbon chain, associated with positive charge conferred by the amino group, suggests translocation of the compound through membranes acting on intracellular organelles, as well as interacting with the parasite. NTPDase 1 can be a novel therapeutic target, and SSEC can be exploited in new experimental leishmaniasis protocols.

Keywords: *Leishmania braziliensis*. NTPDase. Antileishmanial compounds. N-alkylaminoalkanethiosulfuric acids.

1 INTRODUÇÃO

A *Leishmania (Viannia) braziliensis*, protozoário transmitido pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectados, é considerado o principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. O tratamento, efetuado com antimonial pentavalentes, ou com aqueles de segunda escolha, como a anfotericina B ou pentamidina, causa efeitos tóxicos e colaterais indesejados, tem alto custo e leva à resistência clínica, tornando relevante a descoberta de novos meios de tratamento para estas doenças (MENEZES *et al.*, 2015; PORCINO, 2016). O metabolismo de diversas espécies de *Leishmania* está sendo investigado e várias proteínas já foram indicadas como alvos em potencial de drogas leishmanicidas (CUERVO *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2011).

A proteína nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase 1) foi recentemente identificada em promastigota e amastigota de *Leishmania (V.) braziliensis* (REZENDE-SOARES *et al.*, 2010; PORCINO *et al.*, 2012; PORCINO, 2016). Esta enzima pertence à família das NTPDases, proteínas que compartilham cinco domínios conservados

(“apyraseconservedregions”) e a capacidade de hidrolisar nucleosídeos di- e trifosfatados aos respectivos nucleosídeos monofosfatados, sob a ativação de íons bivalentes. Diferem na localização celular, na especificidade para os substratos e na dependência aos diversos íons bivalentes (KNOWLES, 2011). Em parasitos, as NTPDases participam da regulação da concentração de nucleotídeos em diferentes processos biológicos, como a recuperação de purinas, e em outros envolvidos nos mecanismos de evasão aos sistemas de defesa do hospedeiro, tendo sido sugeridas como possíveis alvos para o tratamento e/ou prevenção de doenças (AL-RASHIDA; IQBAL, 2014; MARCONATO *et al.*, 2017; PAES-VIEIRA *et al.*, 2018). As NTPDases 1 de espécies distintas de *Leishmania* foram caracterizadas como antigênicas e, por meio de análises de bioinformática e experimental, foi identificado um domínio denominado B nas estruturas primárias destas proteínas, o qual é também compartilhado com NTPDases de plantas e de outros organismos patogênicos (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; COIMBRA *et al.*, 2008; REZENDE-SOARES *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2011; MAIA *et al.*, 2011; PORCINO *et al.*, 2012; DETONI *et al.*, 2012; 2013; MAIA *et al.*, 2013).

ANTPDase 1 foi localizada em membrana plasmática e organelas subcelulares, incluindo a mitocôndria, de promastigota e amastigota de *L. (V.) braziliensis* (REZENDE-SOARES *et al.*, 2010; PORCINO *et al.*, 2012; PORCINO, 2016), motivando a identificação de novos compostos leishmanicidas e a indicação desta proteína como um novo alvo na terapia contra as leishmanioses. Alguns representantes dos ácidos N-alquilaminoalcanotiossulfúricos (AAATs), de baixa toxicidade para mamíferos, já caracterizados como esquistossomicidas e inibidores de SmATPDase de *S. mansoni* (PENIDO *et al.*, 2007; 2008), apresentaram também atividade antileishmanial quando avaliados *in vitro* (PORCINO, 2016). Diversos mecanismos de ação podem estar envolvidos na atividade letal dos AAATs (PORCINO, 2016), entre eles o efeito inibitório sobre a atividade fosfohidrolítica da NTPDase de *L. (V.) braziliensis*, o que é demonstrado neste trabalho pelo SSEC [ácido 2-(sec-butilamino)-1-octanotiossulfúrico], um representante desta série de compostos.

2 METODOLOGIA

2.1 Síntese de ácidos alquilaminoalcanotiossulfúricos (AAATs) e análise de bioinformática

Os compostos ácido 2-(sec-butilamino)-1-octanotiossulfúrico (SSEC) e ácido 1-(terc-butilamino)-2-etanotiossulfúrico (TBSO) (Figura 1) foram obtidos na forma de sólidos cristalinos, solúveis em solventes orgânicos (PENIDO *et al.*, 1990). Para obtenção do modelo tridimensional do SSEC e predição de pH foram usados os servidores Chemicalize (<http://www.chemicalize.org/structure>) e ACD/labs (<http://www.acdlabs.com>).

Figura 1 – Ácidos alquilaminoalcanotiossulfúricos (AAATs)



Fonte: PORCINO, 2016.

2.2 Obtenção de promastigotas e preparação de proteínas

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram coletadas na fase estacionária de crescimento (10^6 parasitas/mL). Os parasitos foram lavados por três vezes (Tris-HCl 5 mM, pH 7,4) a 4°C e, após centrifugação a 3000 x g por 10 minutos, foram ressuspensos em Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, acrescido de 8% de sacarose, leupeptina (0,5 µg/mL), pepstatina (0,07 µg/mL), inibidor de tripsina (50 µg/mL) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (2 µg/mL). Após três ciclos de congelamento e descongelamento e um ciclo de ultrasonicação por 30 minutos, a preparação foi armazenada a -80°C até o uso (PORCINO *et al.*, 2012).

2.3 Medida da atividade fosfohidrolítica de promastigota na presença de SSEC ou TBSO

A preparação de promastigotas (0,1 mg proteína/mL) foi pré-incubada por 30 minutos a 37°C com SSEC ou TBSO nas concentrações de 1 µM a 1000 µM em meio de reação (MOPS 50 mM, pH 7,4, 1 mM CaCl₂, 100 µM de ortovanadato de sódio). A medida

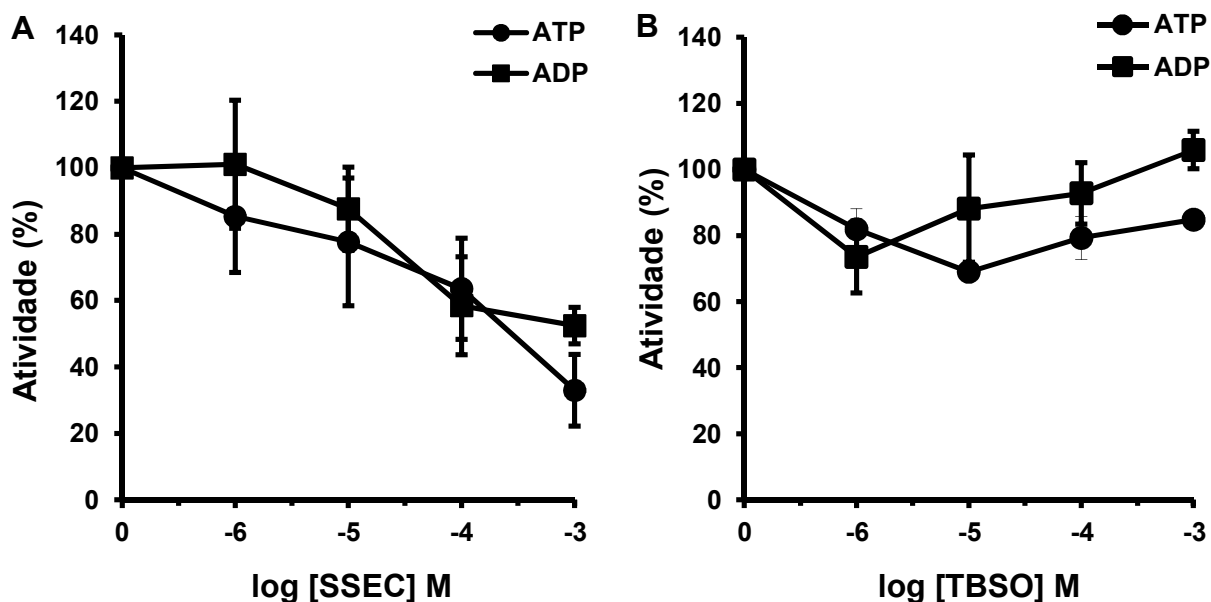
de atividade fosfohidrolítica foi iniciada pela adição de 3 mM do substrato ATP ou ADP e, após 60 minutos de incubação a 37°C, foi interrompida pela adição de HCl 0,1 N. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada espectrofotometricamente (PORCINO, 2016). Como controle, as amostras foram incubadas sem a adição do AAAT e na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) 2,5% (v/v), o solvente usado para solubilizar os compostos. Foram feitos quatro experimentos em triplicata, e os dados foram analisados pelo Teste *t* student, sendo considerados significativos quando $P < 0,05$ (PORCINO, 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A preparação de promastigotas foi pré-incubada durante 30 minutos a 37°C com SSEC (A) ou TBSO (B) nas concentrações de 1 a 1000 μM e, em seguida, as atividades ATPásica e ADPásica foram medidas em meio de reação padrão (Figura 2). Uma progressiva e significativa redução da atividade ATPásica, dependente da concentração de SSEC, foi observada quando comparada ao controle (Figura 2A; 1 μM , 15%; 10 μM , 22%; 100 μM , 36%; 1000 μM , 67%; $P < 0,01$). Inibição significativa ($P < 0,01$) da atividade ADPásica foi também observada nas concentrações 100 μM (42%) e 1000 μM (48%) (Figura 2A). Por outro lado, o derivado TBSO reduziu as atividades ATPásica e ADPásica (Figura 2B) em até 30%, sendo menos efetivo que o SSEC (Figura 2A).

O SSEC tem um radical alquil de 4 átomos de carbono que confere à molécula um caráter apolar, o que é aumentado com a adição de cadeia lateral hidrocarbonada com 8 átomos de carbono (Figura 1), como também ilustrado em seu modelo tridimensional na Figura 3A. O TBSO tem um radical alquil de 4 átomos de carbono e uma cadeia lateral de apenas 2 carbonos, conferindo-lhe menor caráter apolar (Figura 1). Os radicais amino e tiosulfato, em ambos os compostos, fornecem o caráter hidrofílico, sustentando estes AAATs como moléculas anfipáticas (Figura 1 e 3A). O modo pelo qual o SSEC inibe a NTPDase 1 pode envolver ligação hidrofóbica, dissulfeto e/ou de hidrogênio, estas duas últimas proporcionadas pelo grupo tiosulfato e amino, respectivamente. A fraca inibição da atividade fosfohidrolítica pelo TBSO, que também não mostrou atividade antileishmanial significativa (PORCINO, 2016), fortalece a hipótese de que interações hidrofóbicas com esta proteína contribuem para o efeito inibitório observado pelo SSEC.

Figura 2 –Efeitos do (A) SSEC e (B) TBSO sobre a atividade fosfohidrolítica de preparação de promastigotas. A média de atividade ATPásica ou ADPásica na presença de 2,5% (v/v) de DMSO (controle 100%) foi $17,10 \pm 3,94$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹ e $7,85 \pm 1,71$ nmol Pi.mg⁻¹.min⁻¹, respectivamente. A Figura mostra a média de quatro experimentos para cada AAAT, feitos em triplicata



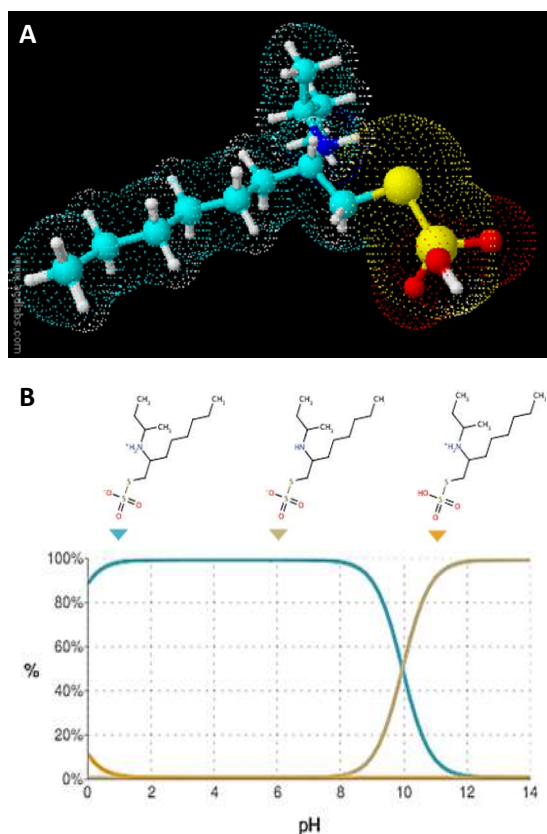
Fonte: PORCINO, 2016.

Estudos preditivos de alteração de carga líquida do SSEC em função do pH foram efetuados (Figura 3B). Em uma variação de pH de 1 a 8 o estado de ionização do SSEC é identicamente mantido (100%), e o radical amino permanece protonado, gerando carga positiva, enquanto a hidroxila do radical tiosulfato é desprotonada, gerando carga negativa. Somente em $\text{pH} < 1$ ou $\text{pH} > 10$, há espécies com carga líquida positiva ou negativa, respectivamente. O potencial antileishmanial do SSEC foi testado e, como demonstrado previamente, este AAAT inibiu o crescimento das formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis* (PORCINO, 2016). A lipofilia do SSEC, conferida pela cadeia carbônica, associada à sua hidrofiliçidade, proporcionada por cargas, possivelmente possibilitam a translocação do composto por membranas atuando em organelas intracelulares do hospedeiro, interagindo também com o parasito.

Os AAATs são efetivos inibidores reversíveis da atividade NTPDásica do tegumento de verme adulto de *S. mansoni* e, também, da apirase de batata (PENIDO *et al.*, 2007),

uma proteína de planta que tem alta identidade com as NTPDases de parasitos (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; MAIA *et al.*, 2011). Foi também mostrado que os AAATs são capazes de formar ligação dissulfeto com resíduos de cisteína da proteína do *S. mansoni*, inibindo parcialmente sua atividade, e que a mudança do pH do meio de reação padrão, de 7,4 para 6,5, não afetou a inibição observada (PENIDO *et al.*, 2007), dados que corroboram estes mostrados aqui e que sugerem efeitos similares sobre a NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*. Portanto, os resultados apresentados neste trabalho motivam novos estudos sobre os efeitos inibitórios observados, o que pode contribuir para o estudo estrutural da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis*.

Figura 3 –(A), modelo tridimensional do SSEC mostrando a cadeia hidrocarbonada hidrofóbica composta de um radical alquil de 4 átomos de carbono (C; sec-butil) combinado à um radical alcano de 8 C (octano), como evidenciados pelos átomos C e H em azul e branco, respectivamente. O átomo de N do radical amino é mostrado em azul escuro, enquanto os átomos de S e O do radical tiosulfato estão representados em amarelo e vermelho, respectivamente (<http://www.acdlabs.com>). (B), predição de carga líquida do SSEC em diferentes pHs (<http://www.chemicalize.org/structure>)



Fonte: Emídio, NB. Arquivo do Laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteínas; PORCINO, 2016.

É de relevância destacar que os AAATs não têm efeito citotóxico *in vitro* sobre macrófagos (PORCINO, 2016), confirmando dados da literatura que evidenciam a baixa toxicidade destes compostos quando usados por via oral para o tratamento da esquistossomose experimental (PENIDO *et al.*, 2008). Portanto, o SSEC poderá ser usado em protocolos de tratamento da leishmaniose experimental, com variação de doses e frequência, administradas oralmente, podendo comprovar a eficácia deste novo antileishmanial.

5 CONCLUSÃO

O ácido 2-(sec-butilamino)-1-octanotiosulfúrico (SSEC) é um composto de baixa citotoxicidade quando administrado por via oral em infecção experimental e sua atividade antileishmanial *in vitro* foi recentemente mostrada. A suscetibilidade da NTPDase 1 de *L. (V.) braziliensis* ao SSEC foi evidenciada neste trabalho pela inibição parcial da atividade fosfolítica em preparação total de promastigotas, sendo este um indício de seu modo de ação. Esta proteína pode ser um alvo a ser explorado em novas estratégias terapêuticas contra as leishmanioses e o SSEC em protocolos experimentais de leishmanioses.

6 AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG (processo CBB-APQ-2008-12). Ao Dr. Marcus Luiz de Oliveira Penido (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG) e ao Dr. David Lee Nelson (Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG), pela síntese e doação dos compostos.

REFERÊNCIAS

AL-RASHIDA, Mariya; IQBAL, Jamshed. Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, p. 703-743, jul. 2014.

COIMBRA, Elaine et al. A *Leishmania (L.) amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrases share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. **Parasitology**, v. 135, p. 327-335, mar. 2008.

COSTA, Tatiane et al. Energetic metabolism of axenic promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 438–443, aug. 2011.

CUERVO, Patricia et al. Proteomic characterization of the released/ secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 79-92, nov. 2009.

DETONI, Michelle et al. Galls from *Calliandra brevipes* BENTH (Fabaceae: Mimosoidae): evidence of apyrase activity contribution in a plant-insect interaction. **Australian Journal of Botany**, v. 60, p. 559-67, sep. 2012.

DETONI, Michelle et al. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2773-82, aug. 2013.

FARIA-PINTO, Priscila et al. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v. 135, p. 943-953, jul. 2008.

KNOWLES, Aillen. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, p. 21-45, mar. 2011.

MAIA, Ana et al. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, p. 1059-1067, out. 2011.

MAIA, Ana et al. An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is a target of inhibitory antibodies. **Parasitology International**, v. 62, p. 44-52, fev. 2013.

MARCONATO, Danielle et al. Antischistosome antibodies change NTPDase 1 activity from macrophages. **Parasite Immunology**, ID39:e12487. <https://doi.org/10.1111/pim.12487>, aug. 2017.

MENDES, Rita et al. Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) and immunolocalization of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 808-813, nov. 2011.

MENEZES, Juliana et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, ID 815023, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/815023>, may, 2015.

PAES-VIEIRA, Lisvane et al. NTPDase activities: possible roles on *Leishmania* spp infectivity and virulence. **Cell Biology International**, v. 42, p. 670–682, jun. 2018.

PENIDO, Marcus et al. Antischistosomal activity of aminoalkanethiols,

aminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. **ActaTropica**, v. 108, p. 249-255, oct. 2008.

PENIDO, Marcus et al. Synthesis of potential schistosomicides: new 2-(alkylamino)-1-octanethiosulphuric acids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 1, p. 35-40, 1990.

PENIDO, Marcus et al. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **EuropeanJournalofPharmacology**, v. 570, p. 10-17. jun. 2007.

PORCINO, G. N. **Caracterização da NTPDase 1 de *Leishmaniabraziliensis* como um alvo terapêutico em formas promastigota e amastigota e suscetibilidade à leishmanicidas**. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

PORCINO, Gabriane et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1): localization and *in vitro* inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 293-299, aug. 2012.

REZENDE-SOARES, Fabrícia et al. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, v. 137, p. 773-783, apr. 2010.