

# ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ORGANOMETÁLICOS DE RUTÊNIO SOBRE CATEPSINAS LISSOSSOMAIS

Fernanda Berthier Gomes<sup>1</sup>; Aline Sandim<sup>2</sup>; Douglas Wagner Franco<sup>3</sup>;  
Wagner Alves de Souza Júdice<sup>4</sup>

Estudante do Curso de Medicina da UMC; e-mail: fernandaberthier@hotmail.com<sup>1</sup>

Estudante de Mestrado de Biotecnologia da UMC; e-mail: aline\_sandim@hotmail.com<sup>2</sup>

Professor da USP - Instituto de Química de São Carlos<sup>3</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes - CIIB; e-mail: wagneras@umc.br<sup>4</sup>

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Catepsinas Lisossomais; Inibidores; Organometálicos de Rutênio

## INTRODUÇÃO

As catepsinas possuem diversas funções específicas, como processo de degradação proteica durante a morte celular por necrose ou autofagia, apresentação antigênica mediada por MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe II, diferenciação de queratinócitos, ativação de pró- hormônios, entre outros (TURK et. al., 2002; VISILJEVA et.al., 2007). Elas estão presentes em praticamente todos os tecidos humanos, como as catepsinas B, L, V, H, C, X, F e O, indicando que essas proteases são responsáveis por processos celulares normais, como a degradação proteica, porém, as catepsinas K e S possuem uma distribuição mais restrita indicando sua participação em processos mais específicos (SALMINEN-MANKONEN et. al., 2007). Além desta importância nos processos fisiológicos, as catepsinas também desempenham envolvimento direto em processos patológicos diversos (NELSON et.al., 2006). Os complexos de rutênio tem grande importância no tratamento do câncer, sendo bem tolerados in vivo, sendo muito menos tóxicos que a cisplatina (KOSTOVA, 2006), estes efetuam forte ligação com a albumina e a transferina influenciando diretamente a biodistribuição dos complexos e na capacidade de inibir a angiogênese e as metaloproteases de matriz (MMPs), inibindo, assim, o processo de metástase in vivo (ALAMA et. al., 1991).

## OBJETIVOS

O presente projeto de iniciação científica tem por objetivo identificar compostos organometálicos de rutênio como possíveis inibidores de catepsinas lisossomais.

## METODOLOGIA

As catepsinas K, L e V recombinantes humanas foram expressas em *Pichia pastoris* de acordo com a metodologia descrita previamente por Linnevers e colaboradores (LINNEVERS et.al., 1997) e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da University of British Columbia, Vancouver, Canadá. A concentração molar das enzimas foi determinada por titulação do sítio ativo com E-64 [L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano], de acordo com o procedimento descrito por Barrett e colaboradores (BARRETT et. al, 1982). Foram testados 14 compostos Organometálicos de Rutênio foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Douglas Wagner Franco, da Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos. Nos ensaios cinéticos foi usado tampão acetato de sódio 100mM, com 5mM de EDTA, pH 5,5. Alíquotas da enzima foram pré-incubadas com DTT 5mM durante 5min a 37°C. Suas hidrólises foram seguidas pela medição da

fluorescência (substrato Z-FR-MCA  $\rightarrow$   $\lambda_{ex}$  360nm e  $\lambda_{em}$  480nm) em um espectrofluorímetro Hitachi F2500, como descrito previamente. Os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não linear usando o programa GarFit 5.0 (Erithacus Software Ltda) (WILKINSON, 1961).

Os ensaios de inibição das proteases foram similares aos ensaios de hidrólise de substratos, entretanto, após a ativação enzimática e medição da atividade inicial das catepsinas, procedeu-se a adição de concentrações crescentes de inibidor até a não observação da redução da atividade enzimática, onde a velocidade de reação se estabilizou. Com os dados adquiridos foi possível calcular o  $IC_{50}$ , que corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores de  $IC_{50}$  da inibição das Catepsinas K, L e V. A análise dos resultados mostra que, para a Catepsina K, o composto com melhor atividade inibitória foi o Ru04, com um valor de  $IC_{50} = 27 \pm 1 \mu M$ . Para a Catepsina L, o melhor composto foi o Ru13 com valor de  $IC_{50} = 3,7 \pm 0,2 \mu M$  e para a Catepsina V, o melhor foi o Ru02, com  $IC_{50} = 2,5 \pm 0,2 \mu M$ . Por outro lado, os inibidores menos potentes para as Catepsinas K, L e V foram, respectivamente, os Ru10 ( $IC_{50} = 444 \pm 38 \mu M$ ), Ru10 ( $IC_{50} = 54 \pm 3 \mu M$ ) e Ru12 ( $IC_{50} = 311 \pm 44 \mu M$ ). Vale ressaltar que um mesmo composto não foi, suficientemente, potente para inibir todas as enzimas testadas o que estabelece certa seletividade.

Analisando a presença de óxido nítrico (NO) ou sulfato ( $SO_4$ ) na molécula de rutênio para o mesmo ligante (pic, nic, py, isn e ImN) observamos que em geral as Catepsinas K e L foram entre 2 a 9 vezes mais inibidas pela presença de NO do que  $SO_4$ , entretanto, não verificou-se grandes diferenças na inibição da Catepsina V com exceção do Ru02 contendo NO que foi 10 vezes mais potente que seu similar contendo  $SO_4$ .

**Tabela 1.** Valores de  $IC_{50}$  e os desvios dos Organometálicos de Rutênio frente às Catepsinas K, L e V.

INIBIDOR	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )		
	CAT K	CAT L	CAT V
Ru01 $\rightarrow(SO_4)$ pic	435 $\pm$ 29	54 $\pm$ 3	19 $\pm$ 2
Ru02 $\rightarrow(NO)$ nic	70 $\pm$ 6	9,2 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,2
Ru03 $\rightarrow(SO_4)$ py	406 $\pm$ 26	24 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1
Ru04 $\rightarrow(SO_4)$ isn	27 $\pm$ 1	4,4 $\pm$ 0,1	10 $\pm$ 1
Ru05 $\rightarrow(NO)$ ImN	148 $\pm$ 12	4,9 $\pm$ 0,2	11,5 $\pm$ 0,2
Ru06 $\rightarrow(NO)$ pic	125 $\pm$ 13	6,6 $\pm$ 0,8	26 $\pm$ 3
Ru07 $\rightarrow(NO)$ py	225 $\pm$ 17	5,5 $\pm$ 0,1	10 $\pm$ 1
Ru08 $\rightarrow(SO_4)$ nic	617 $\pm$ 31	40 $\pm$ 1	24 $\pm$ 1
Ru09 $\rightarrow(NO)$ isn	89 $\pm$ 3	18,5 $\pm$ 0,4	13,2 $\pm$ 0,5
Ru10 $\rightarrow(SO_4)$ ImN	444 $\pm$ 38	57 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2
Ru11 $\rightarrow T-[Ru(NH_3)_5Cl]Cl_2$	428 $\pm$ 11	16 $\pm$ 2	18 $\pm$ 1
Ru12 $\rightarrow T-[Ru(NH_3)_5OH_2]S_2O_6$	225 $\pm$ 40	34,1 $\pm$ 0,3	311 $\pm$ 44
Ru13 $\rightarrow cis-[Ru(NH_3)(OH_2)_2]$	32 $\pm$ 4	3,7 $\pm$ 0,2	23 $\pm$ 1
Ru14 $\rightarrow T- RuP(III)NO^+$	127 $\pm$ 11	20 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1

## CONCLUSÕES

Há crescentes evidências da contribuição das cisteíno-catepsinas nos eventos proteolíticos relacionados à progressão tumoral, tais como proliferação celular, apoptose, angiogênese tumoral, invasão tecidual e metástase, indicando que elas são alvo em potencial para o desenvolvimento de drogas no tratamento do câncer. Em geral os compostos organometálicos de rutênio aqui analisados foram pouco efetivos na inibição da catepsina K, sendo melhores na inibição das catepsinas L e V.

Nossos estudos de varredura de moléculas ativas associados a estudos complementares de determinação de mecanismo de inibição e constante de inibição  $K_i$  e modelagem molecular enzima-inibidor fornecerá informações fundamentais para o desenho de novas moléculas mais efetivas que possam atuar no controle da atividade das catepsinas nos processos patológicos as quais estão envolvidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAMA, A.; TASSO, B.; NOVELLI, F.; SPARATORE, F. **Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents.** Drug Discovery Today, v. 14, p. 500-508, 2009.

BARRETT, A.J.; BEMBHAVI, A.A.; BROWN, M.A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C.G.; TAMAI, M.; HANADA, K. **L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogs as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L.** Biochemical Journal, v. 201, p. 189-198, 1982.

KOSTOVA, J. **Ruthenium complexes as anticancer agents.** Current Medicinal Chemistry, v. 13, p. 1085-1107, 2006.

LINNEVERS C. J.; MCGRATH M.E.; ARMSTRONG, R.; MISTRY, F.R.; BARNES, M.G.; KLAUS, J.L.; PALMER, J.T.; KATZ, B.A.; BROMME, D. **Expression of human cathepsin K in Pichia pastoris and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex.** Protein Science, v. 6, p 919-921, 1997.

NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER, A.L. **Lehninger princípios de bioquímica.** 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

SALMINEN-MANKONEN, H.J.; MORKO, J.; VUORIO, E. **Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis.** Current Drug Targets, v. 8, p. 315-323, 2007.

TURK, V.; TURK, B.; GUNCAR, G.; TURK, D.; KOS, J. **Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen presentation and cancer.** Advances in Enzyme Regulation, v. 42, p. 285-303, 2002.

VISILJEVA, O.; REINHECKEL, T.; PETERS, C.; TURK, D.; TURK, V.; TURK, B. **Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets.** Current Pharmaceutical Design, v. 13, p. 387-403, 2007.

WILKINSON, G.N. Statistical estimations in enzyme kinetics, Biochemical Journal, Austrália, v. 80, n. 2, p. 324-332, 1961.