CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE RUTÊNIO COMO INIBIDORES DA PROTEASE DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA (FMDV - FOOT AND MOUTH DISEASE VÍRUS) Lb^{pro}

Gabriel Domingues dos Santos¹, Douglas Wagner Franco², Luiz Juliano³, Jorge Alexandre Nogueira Santos⁴, Wagner Alves de Souza Judice⁵

Estudante do Curso de Medicina da UMC; e-mail: gabrieldomingues182@yahoo.com.br¹

Professor da USP - Instituto de Química de São Carlos²

Professor da UNIFESP – Departamento de Biofísica³

Professor do IFSULDEMINAS⁴

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br⁵

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Cisteíno-proteases, Inibidores, Organometálicos de Rutênio, Lb^{pro}, Febre Aftosa

INTRODUÇÃO

Cisteíno proteases desempenham importante papel no metabolismo protéico celular, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, e na degradação de proteínas da matriz extracelular e estão envolvidas em muitas patologias (II Et al., 1993). O vírus da febre aftosa (FMDV) é um patógeno que afeta uma grande variedade de animais biungulados de importância agrícola e econômica em todo o mundo. A Lb^{pro} é uma cisteíno protease do FMDV envolvida na clivagem do fator de iniciação do hospedeiro eucariótica (eIF4), GI e 4GII, facilitando a tradução viral e diminuindo a síntese de Interferon - gama, favorecendo a replicação viral (GUARNÉ, A. et al., 1998) (SKERN, T., FITA, I. & GUARNÉ, A., 1998). Os complexos de rutênio tem grande importância no tratamento do câncer, sendo muito menos tóxico que a cisplatina, 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 metalo proteases de matriz (MMPs), inibindo o processo de metástase in vivo (KOSTOVA, J., 2006) (ALAMA, A. et al., 2009).

OBJETIVOS

O presente projeto de iniciação científica tem por objetivo o estudo de compostos organometálicos de rutênio como possíveis inibidores da cisteíno protease do vírus da febre aftosa (Foot and Mouth Disease Virus - FMDV).

METODOLOGIA

Nos ensaios cinéticos da Lb^{pro} foi usado tampão borato/borax 50mM, pH 7,8. Alíquotas da enzima foi pré-incubada com DTT 2.5mM durante 5min a 37°C. Suas hidrólises foram seguidas pela medição da fluorescência (substrato Abz-KVQRKLGAGQ-EDDnp → λ_{ex} 320nm e λ_{em} 420nm) em um espectrofluorímetro Hitachi F2500. Os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não linear usando o programa Garfíc 5.0. Os ensaios de inibição da protease foram similares aos ensaios de hidrólise do substrato, entretanto, após a ativação enzimática e medição da atividade inicial da Lb^{pro}, procedeu à adição de concentrações crescentes de inibidor até a estabilização do decaimento da atividade enzimática. Com os dados adquiridos calculamos o IC₅₀ que

corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%.

MATERIAIS / INSTRUMENTOS

A construção do plasmídeo foi realizado pelo prof. Tim Skern do Max F. Perutz do Laboratório do Departamento de Bioquímica Médica, Universidade de Vienna, Áustria. A enzima foi expressa e purificada de acordo com (KIRCHWEGER, R.,1994) (GUARNÉ, A. et al., 2000) e gentilmente cedidas pelo professor Jorge Alexandre Nogueira Santos do Instituto Federal do Sul de Minas. O substrato Abz-KVQRKLGAGQ-EDDnp foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Maria Aparecida Juliano da Universidade Federal de São Paulo e sua concentração determinada em função da massa molar e volume de solução preparada.

Foram utilizados 14 compostos organometálico de rutênio que foram nomeados por letras e números, para uso específico no laboratório. Os compostos foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Douglas Wagner Franco da Universidade de São Paulo do Instituto de Química de São Carlos.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra que o composto Ru-01, constituído pelo $(SO_4)_{pic}$, apresentou a melhor atividade inibitória com um valor de $IC_{50} = 9,2 \pm 0,4 \mu M$ e o segundo melhor organometálico de rutênio denominado Ru-13, constituído pelo isômero *cis* da molécula $Ru(NH_3)(OH_2)_2$, mostrou um $IC_{50} = 9,8 \pm 0,4 \mu M$. Por outro lado, com o Ru-12 apresentando a fórmula *trans* do isômero $[Ru(NH_3)_5OH_2]S_2O_6$, verificamos o pior IC_{50} ($118 \pm 5 \mu M$).

É possível analisar a eficiência de alguns desses compostos através da presença de Óxido Nítrico (NO) ou Sulfato (SO_4). Observou-se que, no geral, os organometálicos de rutênio homólogos derivados do NO apresentaram IC_{50} melhores do que os derivados do SO_4 (Tabela 2). A maior disparidade é observada entre o Ru-05 [(NO) ImN] e Ru-10 [(SO_4) ImN], em que o IC_{50} do primeiro é quase 4 vezes menor do que o do segundo.

Tabela 1. Organometálicos de rutênio e seus respectivos valores de IC_{50} na inibição da Lb^{pro} .

Organometálicos de Rutênio	Lb^{pro} IC_{50} (μM)	Organometálicos de Rutênio	Lb^{pro} IC_{50} (μM)
Ru-01	$9,2 \pm 0,4$	Ru-08	19 ± 1
Ru-02	$13,1 \pm 0,2$	Ru-09	20 ± 1
Ru-03	34 ± 1	Ru-10	42 ± 1
Ru-04	40 ± 2	Ru-11	57 ± 1
Ru-05	11 ± 1	Ru-12	118 ± 5
Ru-06	14 ± 1	Ru-13	$9,8 \pm 0,4$
Ru-07	21 ± 2	Ru-14	18 ± 2

Tabela 2. Comparação dos IC_{50} dos organometálicos de rutênio contendo óxido nítrico (NO) ou sulfato (SO_4) em função do mesmo ligante, na inibição da Lb^{pro} .

NO	IC_{50} (μM)		SO_4
(NO) pic – Ru-06	14 ± 1	$9,2 \pm 0,4$	(SO_4) pic – Ru-01
(NO) nic – Ru-02	$13,1 \pm 0,2$	19 ± 1	(SO_4) nic – Ru-08
(NO) py – Ru-07	21 ± 2	34 ± 1	(SO_4) py – Ru-03
(NO) isn – Ru-09	20 ± 1	40 ± 2	(SO_4) isn – Ru-04
(NO) ImN – Ru-05	11 ± 1	42 ± 1	(SO_4) ImN–Ru-10

CONCLUSÕES

Os organometálicos de rutênio apresentaram valores de IC₅₀ entre 9 e 118 µM. Os compostos apresentando óxido nítrico (NO) na molécula comparativamente aos seus homólogos contendo sulfato (SO₄) foram mais efetivos na inibição da Lb^{pro}. A obtenção de informações complementares (constante de inibição e mecanismo de inibição) das moléculas com melhores valores de IC₅₀ são necessárias no desenvolvimento de novos fármacos para a febre aftosa. Além disso, os estudos de inibição da Lb^{pro} servirá como modelo experimental para análises das proteases de picornavirus incluindo o poliovírus, vírus da hepatite A, rinovírus e vírus da encefalomiocardite cujas cisteíno proteases apresentam grande similaridade estrutural e funcional com a Lb^{pro}.

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.

GUARNE, A.; Hampoelz, B.; Glaser, W.; X. Carpena, J. Tormo, I. Fita, T. Skern. **J. Mol. Biol.**, 302 (2000), pp. 1227–1240

GUARNE, A.; Tormo, J., Kirchweger, K., Pfistermueller, D., Fita, I. & Skern, T. (1998). **EMBO J.** 17, 7469-7479.

II, K.; ITO, H.; KOMINAMI, E.; HIRANO, A. (1993) Virchows Arch A 423: (3) 185-194.

KIRCHWEGER, R.; Ziegler, E; Lamphear, B.J; D. Waters, H.D. Liebig, W. Sommergruber, F. Sobrino, C. Hohenadl, D. Blaas, R.E. Rhoads, T.J. Skern. **J. Virol.**, 68 (1994), pp. 5677–5684

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

SKERN, T., FITA, I. & GUARNE, A. (1998). **J. Gen. Virol.** 79, 301-307.

AGRADECIMENTOS:

FAEP, FAPESP, CNPq e CAPES.