

CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES PARA A PROTEASE MAJORITÁRIA DO *TRYPANOSOMA CRUZI* (CRUZAÍNA), ENVOLVIDA COMO FATOR DE VIRULÊNCIA.

Larissa de Oliveira Passos Jesus¹, Alyne Alexandrino Antunes², Daniel Moreno Garcia², Luiz Juliano³, Wagner Alves de Souza Judice⁴

Graduada do Curso de Farmácia da UMC; lari.opj@hotmail.com¹

Mestre pelo programa Biotecnologia da UMC; aline-alexandrino@hotmail.com²

Mestre pelo programa Biotecnologia da UMC; danielm-g@hotmail.com²

Professor da UNIFESP; ljuliano@terra.com.br³

Professor da UMC; wagneras@umc.br⁴

Área do Conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Tripanossomíase, cisteíno protease, inibidor enzimático, compostos ciclopaladados

INTRODUÇÃO

Em protozoários como o *T. cruzi*, agente causal da doença de Chagas, as enzimas do tipo cisteíno-proteases desempenham importante papel no metabolismo protéico celular, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, e na degradação de proteínas de matriz extracelular. As cisteíno-proteases possuem múltiplas funções que envolvem desde a invasão celular até o escape do parasito do sistema imune do hospedeiro. Considerando-se o papel essencial dessa classe de enzimas no ciclo de vida do *T. cruzi*, algumas proteases têm sido selecionadas como alvos para o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos. A cruzaína constitui a mais abundante cisteíno-protease do *T. cruzi* e tem sido alvo no desenvolvimento de vários inibidores potentes e seletivos (DIAS, 2009; SIEWINSKI *et al*, 1994; IIK, KOMINAMI, HIRANO, 1993; MORT, BUTTLE, 1997; TANIGUCHI *et al*, 1993; DRENTH *et al*, 1968). No desenvolvimento de novos inibidores, grande interesse tem sido dado à descoberta de novos fármacos a base de metais de transição, especialmente de metais pertencentes ao grupo da platina, que sejam menos tóxicos e, ou possuam um espectro de atividade mais amplo. O paládio, representante deste grupo, é atualmente um potente alvo no desenvolvimento de drogas com atividade antitumoral e antiparasitária (CAIRES *et al*, 1999). Os compostos ciclopaladados apresentam um enorme potencial de aplicação na área de síntese orgânica, permitindo, através das propriedades reacionais da ligação paládio-carbono, a obtenção de um grande número de novos compostos orgânicos, principalmente heterociclos (CAIRES, MAURO, 1996; LUCHE, 1996). Assim sendo, o presente trabalho tem por objetivo a caracterização de compostos ciclopaladados como possíveis inibidores da protease majoritária do *Trypanosoma cruzi*, a Cruzaína.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é a caracterização compostos ciclometalados derivados de paládio como possíveis inibidores da protease majoritária do *Trypanosoma cruzi*, a Cruzaína, envolvida como fator de virulência da doença de Chagas.

METODOLOGIA

A enzima cruzaína foi incubada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, 2,5mM de DTT por 5 minutos a 35°C e a atividade enzimática monitorada pela hidrólise do substrato

Z-FR-MCA em $\lambda_{ex}=360\text{nm}$ e de emissão $\lambda_{em}=480\text{nm}$ em um espectrofluorímetro modelo F-2500 Hitachi. Nos ensaios de inibição procedeu-se a adição de concentrações crescentes de inibidor até a estabilização da queda da atividade enzimática e os dados coletados foram analisados no programa Grafit 5.0 e os valores de IC_{50} s determinados (CHAGAS, JULIANO, PRADO, 1991; OLIVEIRA *et al*, 1996; WILKINSON, 1961). Os compostos ciclopaladados utilizados foram: SE11, SE12, SF11, SF12, RE11, RE12, 45 (A), 10 (A), D2, D2E11, D2E12, D2F11, D2F12, RcPd, RcPdE11, RcPdE12, RcPdF11, 35 (B), 36 (B) e 13 (A), distribuídos entre os grupos A, B, C e D de acordo com o agente de ciclometalação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante os ensaios de inibição são mostrados na tabela 1.

TABELA 1: Compostos ciclopaladados, nome, estrutura molecular e IC_{50} .

Nome do Composto	IC_{50} μM	Grupos	Nome do Composto	IC_{50} μM	Grupos
SE11	$3,8 \pm 0,6$	A	D2E12	82 ± 8	C
RE11	38 ± 3		D2F11	33 ± 2	
SE12	27 ± 2		D2F12	8 ± 1	
RE12	152 ± 11		RcPd	86 ± 5	
SF11	30 ± 2		RcPdE11	$9,3 \pm 0,5$	
SF12	70 ± 14		RcPdE12	53 ± 2	
45 (A)	68 ± 12		RcPdF11	29 ± 3	
10 (A)	8 ± 1		35 (B)	240 ± 30	
D2	43 ± 2		36 (B)	$1,57 \pm 0,05$	
D2E11	52 ± 2		13 (A)	29 ± 2	

Do grupo A (tabela 1), verificamos que os compostos SE11 (fosfina dppe) e 10(A) (fosfoalcino) apresentaram os melhores valores de IC_{50} ($3,86$ e $8,07\mu\text{M}$, respectivamente) na inibição da cruzaina. Dados da literatura mostram que o composto SE11 é capaz de inibir a invasão celular por tripomastigotas, além disso, preveniu o crescimento de amastigotas intracelulares, bem como causa a morte do parasita com mecanismo semelhante a apoptose (MATSUO *et al*, 2010). Igualmente ao SE11, o composto 36(B) foi muito efetivo na inibição da cruzaina (tabela 1). Sabendo-se que esta protease inibe a ativação de macrófagos permitindo a sobrevivência do parasito favorecendo sua replicação e espalhamento da infecção, essas moléculas poderiam de alguma forma reduzir a imunossupressão causada pela doença (MATSUO *et al*, 2010). Os compostos do grupo B (N-benzil-N-metiletanolamina) com fosfina dppe (molecular ou iônico), fosfina dppf (molecular) e não fosfínicos foram de 4 a 10 vezes menos eficientes na inibição enzimática que o composto de referência deste grupo, D2F12 ($IC_{50}=7,96\mu\text{M}$) (tabela 1). Em relação ao

grupo C apresentando benznidazol a qual é a molécula de referência como fármaco na quimioterapia da doença de Chagas, esperávamos um maior número de compostos realmente efetivos na inibição da cruzaina, contudo, entre os compostos RcPd, RcPdE11, RcPdE12 e RcPdF11, somente o fosfínico dppe molecular RcPdE11 foi potente, com $IC_{50}=9,27\mu M$ (tabela 1). O grupo D apresentou os compostos com a pior [35(B) $\rightarrow IC_{50}=240,37\mu M$] e a melhor [36(B) $\rightarrow IC_{50}=1,57\mu M$] atividade inibitória da cruzaina (tabela 1). O composto 35 (B), membro do grupo D, apresentou a pior atividade inibitória da cruzaina com $IC_{50}=240,37\mu M$. e, muito interessantemente, o composto mais potente pertenceu também a este grupo com um $IC_{50}=1,57\mu M$ denominado 36(B), ambos contendo fosfina dppf, porém o primeiro um complexo molecular e o segundo iônico. Completando a série de ciclopaladados, temos o composto iônico 13(A) contendo fosfina dppe apresentando um $IC_{50}=29,20\mu M$ pertencente ao grupo E (tabela 1).

CONCLUSÕES

Através da determinação dos IC_{50} para os compostos ciclopaladados foi possível evidenciar os que apresentaram melhores resultados. Dentre os compostos testados como inibidores da enzima de tripanossomatídeo (cruzaina) observamos que o 36 (B) e o SE11 apresentaram os melhores resultados de IC_{50} , sendo, respectivamente, 152 e 62 vezes mais efetivos na inibição que o composto 35(B) apresentando o pior IC_{50} . Grandes são as perspectivas da utilização dos compostos ciclopaladados como drogas quimioterápicas no tratamento da doença de Chagas, para tanto, ainda é necessário estudos complementares *in vitro* e *in vivo* visando não somente o entendimento do mecanismo de inibição da cruzaina bem como as possíveis toxicidades desta classe de compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAIRES, A.C.F.; ALMEIDA, E. T.; MAURO, A. E.; HEMERLY, J. P.; VALENTINI, S.R. síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopaladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 329-334, 1999.

CAIRES, A.C.F.; MAURO, A.E. Compostos ciclometalados de coordenação intramolecular, **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59, 1996.

CHAGAS, J.R.; JULIANO, L.; PRADO, E.S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins, **Analytical Biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 419–425, 1991.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectiva no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 10 novembro 2009.

DRENTH, J.; JANSONIUS, J.N.; KOEKOEK, R.; SWEN, H.M.; WOLTHERS, B.G. Structure of papain, **Nature**, Groningen, v. 218, n. 145, p. 929-932, 1968.

II K, I.H.; KOMINAMI E.; HIRANO A. Abnormal distribution of cathepsin proteinases and endogenous inhibitors (cystatins) in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease, parkinsonism-dementia complex on Guam, and senile dementia and in the aged. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, Japan, v. 423, n. 3, p.185-194, 1993.

MATSUO, A. L.; SILVA, L. S.; TORRECILHAS, A. C, PASCOALINO, B. S.; RAMOS, T. C.; RODRIGUES, E. L., SCHENKMAN, S.; CAIRES, A. C. F.;

TRAVASSOS, L. R. *In Vitro* and *In Vivo* Trypanocidal Effects of the Cyclopalladated Compound 7a, a Drug Candidate for Treatment of Chagas' Disease. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 54, n. 8, 3318-3325, 2010.

MORT, J.S.; BUTTLE, D.J. Cathepsin B. The **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Canadá, v. 29, n. 5, p. 715-720, 1997.

NETO, V.A. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. 1ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLIVEIRA, M.C.F.; HIRATA, I.Y.; CHAGAS, J.R.; BOSCHCOV, P.; GOMES, R.A.S.; FIGUEIREDO, A.F.S.; JULIANO, L. Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin, **Analytical Biochemistry**, São Paulo, v. 203, n. 1, p. 39-46, 1992.

SIEWINSKI, M.; GUTOWICZ, J.; KIELAN, W.; BOLANOWSKI, M. Cysteine peptidase inhibitors and activator(s) in urine of patients with colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, China, v. 11, n. 6, p. 446-449, 1994.

TANIGUCHI, K.; TOMITA, M.; KOMINAMI, E.; UCHIYAMA, Cysteine proteinases in rat dorsal root ganglion and spinal cord, with special reference to the co-localization of these enzymes with calcitonin gene-related peptide in lysosomes, **Brain Research**, Japan, v. 601, n.1-2, p.143-153, 1993.

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