

ESTUDO DE COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE RUTÊNIO COMO INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Amanda de Carvalho Dosatti¹, Douglas Wagner Franco², Luiz Juliano³,
Wagner Alves de Souza Júdice⁴

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: amandadosatti@hotmail.com¹

Professor da USP – Instituto de Química de São Carlos²

Professor UNIFESP – Departamento de Biofísica³

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes - CIIB; e-mail: wagneras@umc.br⁴

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Cisteíno-Proteases, Organometálicos, Rutênio, Tripanossomatídeos

INTRODUÇÃO

As Cisteíno proteases desempenham importante papel no metabolismo protéico celular, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, na degradação de proteínas da matriz (Li et al., 1993). Na *Leishmania mexicana*, foi observada uma atividade de cisteíno protease consideravelmente maior na forma amastigota de mamíferos do que na forma promastigota, que vive no inseto vetor (North et al., 1981; Coombs et al., 1982; Lockwood et al., 1987; Robertson et al., 1992). Isto sugere que esta alta atividade de CP é de importância crucial para a sobrevivência do amastigota nos macrófagos do hospedeiro mamífero, sendo que a enzima pode tornar-se alvo para o desenvolvimento de drogas anti-leishmaniais baseadas na sua inibição. Cruzipaína, a cisteíno protease majoritária do *Trypanosoma cruzi*, foi identificada como um potencial alvo terapêutico para tratamento da Doença de Chagas (Harth et al., 1993)), pois é reconhecida como um fator de virulência do *T. cruzi*. Os organometálicos são moléculas orgânicas que tem uma alta flexibilidade quanto à manipulação estrutural inserindo grupos periféricos ou adição de átomos metálicos à mesma. Os complexos de rutênio têm grande importância no tratamento do câncer, sendo bem tolerados in vivo (Kostova, 2006).

OBJETIVOS

Determinar os valores de IC₅₀ compostos organometálicos de rutênio na inibição das enzimas rCPB2.8, rCPB3, rH84Y e cruzaína bem como a caracterização dos mecanismos de inibição.

METODOLOGIA

As enzimas cruzaína, rCPB2.8 e suas isoformas (rCPB3, rH84Y) foram incubadas com tampão acetato de sódio, com 2,5mM de ditiotreitól (ativador de cisteíno proteases) por 10min a 35°C e a reação iniciada pela adição de substrato, procedendo-se a leitura com a adição de concentrações crescentes de inibidor até que não haja mais redução da atividade enzimática (Oliveira et al., 1992). Com os dados adquiridos foi possível calcular o IC₅₀. Após os ensaios de determinação dos valores de IC₅₀, os compostos mais ativos foram escolhidos e submetidos aos ensaios cinéticos para determinação do mecanismo de ação e consequentemente obtenção dos valores de Ki. Os estudos dos mecanismos de ação dos inibidores envolveram coleta experimental de dados e o tratamento adequado usando o método de linearização de Lineweaver-Burk (Wilkinson, 1961). Os dados coletados deram origem aos gráficos de duplo-recíprocos e através do

padrão de intersecção das curvas no plano de coordenadas cartesianas, foi possível determinar o mecanismo de ação. Dos interceptos ou dos coeficientes angulares das retas do gráfico dos duplos recíprocos constrói-se os gráficos dos replotes de inclinação ou dos interceptos dos quais obtém-se K_i e αK_i , respectivamente.

MATERIAIS / INSTRUMENTOS

As enzimas rCPB2.8 e suas isoformas rCPB3 e rH84Y de *L. mexicana* foram clonadas em vetor de expressão pQE-30 e obtida a partir de *Escherichia coli* (Sanderson et al., 2000). A cruzaina foi obtida a partir de *E. coli* (cepa DH5 α contendo o plasmídio de expressão) sendo expressa, purificada e ativada seguindo procedimentos previamente reportados (Eakin et al., 1992). O substrato Z-FR-MCA foi obtido comercialmente e utilizado como sonda fluorogênica para acompanhamento da atividade enzimática. Foram testados compostos organometálicos de rutênio, sendo eles (SO₄) pic, (NO) nic, (SO₄) py, (SO₄) isn, ImN (NO), (NO) pic, (NO)py, (9SO₄) nic, (No)isn, (SO₄) ImN, T- [Ru (NH₃)₅Cl] Cl₂, T- [Ru (NH₃)(OH₂)₂] e T- RuP (III) NO⁺, gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Douglas Wagner Franco da Universidade de São Paulo do Instituto de Química de São Carlos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IC₅₀ é o valor da concentração de um inibidor necessária para reduzir pela metade a velocidade da reação. Portanto, quanto menor for o valor de IC₅₀, mais eficiente será o inibidor. Sendo assim, para a enzima CPB2.8 os melhores inibidores foram o Ru2 (IC₅₀ = 3,16 μ M), o Ru7 (IC₅₀ = 4,64 μ M) e o Ru13 (IC₅₀ = 3,52 μ M). Quanto à enzima CPB3.0, foi possível constatar que os inibidores mais eficientes foram os compostos Ru5 (IC₅₀ = 2,30 μ M), Ru9 (IC₅₀ = 1,58 μ M) e Ru10 (IC₅₀ = 3,09 μ M). Em relação à enzima rH84Y, os organometálicos que apresentaram maior eficiência foram o Ru2 (IC₅₀ = 6,96 μ M), o Ru5 (IC₅₀ = 6,69 μ M) e o Ru13 (IC₅₀ = 3,99 μ M). Para a enzima cruzaina os melhores compostos foram o Ru2 (IC₅₀ = 8,36 μ M), Ru5 (IC₅₀ = 12,33 μ M) e Ru9 (IC₅₀ = 11,05 μ M).

TABELA 1. Valores de IC₅₀ determinados para as enzimas CPB2.8, CPB3.0, rH84Y e Cruzaina.

Composto	IC ₅₀ em μ M			
	CPB2.8	CPB3.0	rH84Y	Cruzaina
Ru2	3,16 $\pm$ 0,11	5,9 $\pm$ 0,3	7 $\pm$ 1	8,4 $\pm$ 0,3
Ru3	21 $\pm$ 5	8,6 $\pm$ 1,7	24 $\pm$ 3	6 $\pm$ 3
Ru4	9,1 $\pm$ 0,7	9,2 $\pm$ 0,5	13 $\pm$ 1	56 $\pm$ 4
Ru5	5,1 $\pm$ 1,1	2,3 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,3	12 $\pm$ 1
Ru6	17 $\pm$ 2	10,2 $\pm$ 0,3	20 $\pm$ 1	17,4 $\pm$ 0,5
Ru7	4,6 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,2	11,1 $\pm$ 0,5	21 $\pm$ 3
Ru8	8,5 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1
Ru9	6,5 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 0,5	11,1 $\pm$ 0,5
Ru10	16 $\pm$ 2	3,1 $\pm$ 0,6	13 $\pm$ 1	106 $\pm$ 10
Ru11	9,6 $\pm$ 0,9	4,2 $\pm$ 0,7	18 $\pm$ 1	75 $\pm$ 11
Ru12	21 $\pm$ 4	9,8 $\pm$ 0,8	49 $\pm$ 6	127 $\pm$ 11
Ru13	3,5 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,3	55 $\pm$ 6

(Condições: Tampão acetato de Sódio 100mM, pH 5,5, DTT 2,5mM, 35°C)

Após a determinação dos valores de IC₅₀, foram definidos os mecanismos de inibição do composto Ru2 para as enzimas rCPB2.8 e rH84Y. As Figuras 1A e 1C

correspondem ao plot dos duplos recíprocos na qual as retas estão interseccionando o eixo Y em um mesmo ponto, isso significa que não há variação de velocidade máxima nas várias concentrações do composto Ru2, porém existe variação do K_M . Este perfil define a interação entre enzima e inibidor como um mecanismo de inibição competitivo. A partir das Figuras 1B e 1D, na qual se tem os replotes das inclinações das retas, verifica-se uma reta que define o mecanismo linear simples, determinando, então, uma Inibição Competitiva Linear Simples. Esses replotes permitiram determinar o valor da constante de inibição do organometálico de rutênio Ru2 na inibição das enzimas rCPB2.8 com $K_i = 6,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$ e rH84Y com $K_i = 7,75 \pm 0,02 \mu\text{M}$. A partir destes resultados foi possível estabelecer o mecanismo de inibição competitivo linear simples apresentado na Figura 2, no qual verificamos que o composto Ru2 liga-se exclusivamente à enzima livre.

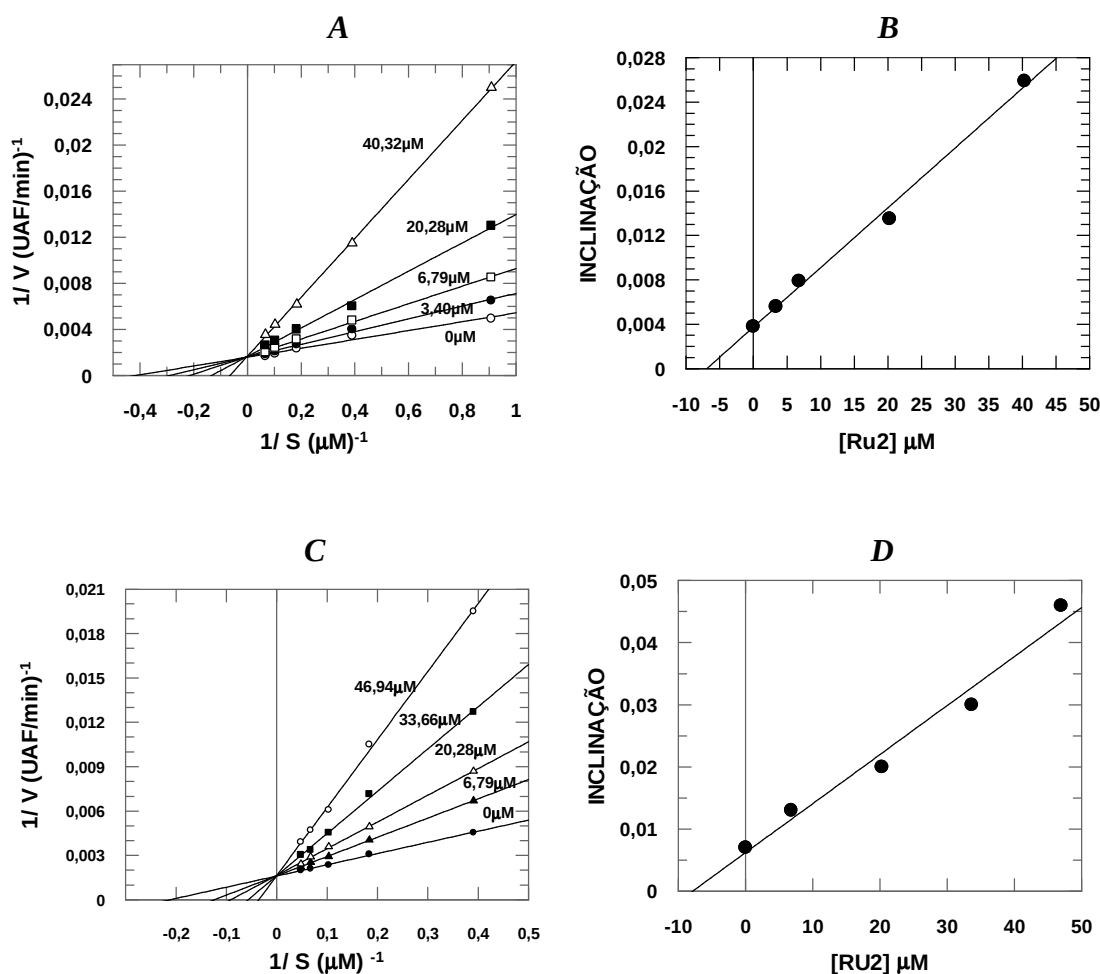


FIGURA 1 - Inibição das cisteíno proteases de *Leishmania mexicana* pelo organometálico de rutênio Ru2.

A) Plote dos duplos recíprocos da inibição da rCPB2.8; **B)** Replote da inclinação. $K_i = 6,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Inibição competitiva linear simples; **C)** Plote dos duplos recíprocos da inibição da rH84Y; **D)** Replote da inclinação. $K_i = 7,75 \pm 0,02 \mu\text{M}$. Inibição competitiva linear simples.

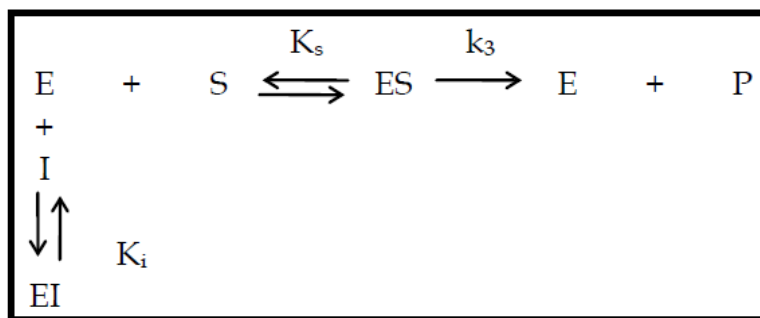


FIGURA 2 - Esquema da interação entre enzima, inibidor e substrato na Inibição Competitiva.

CONCLUSÕES

Os compostos metálicos de rutênio mostraram valores de IC_{50} variando de 1,6 μ M a 127 μ M, sendo que a maioria ficou próxima de 10 μ M. Em geral os compostos foram menos eficientes na inibição da Cruzaína. Isso mostra que estes compostos são mais seletivos às cisteíno proteases de *Leishmania*, tornando-as moléculas promissoras no desenvolvimento de novas drogas antileishmaniais. Tanto a Doença de Chagas quanto a leishmaniose são enfermidades típicas de países pobres ou subdesenvolvidos e são negligenciadas pelas indústrias farmacêuticas, atribuindo maior importância aos nossos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COOMBS, G.H. (1982) *Parasitology*. (84) 149-155.
- EAKIN, A.E.; MILLS, A.A.; HARTH, G.; MCKERROW, J.H.; CRAIK, C.S. (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 7411–7420.
- HARTH G, ANDREWS N, MILLS AA, ENGEL JC, SMITH R, MCKERROW JH. (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.* 58:17-24.
- II, K.; ITO, H.; KOMINAMI, E.; HIRANO, A. (1993) *Virchows Arch A* 423: (3) 185-194.
- KOSTOVA, J. Ruthenium complexes as anticancer agents. *Current Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 1085-1107, 2006.
- LOCKWOOD, B.C.; NORTH, M.J.; SCOTT, K.I.; BREMMER, A.F.; COOMBS, G.H. (1987) *Mol Biochem Parasitol* (24) 89-95.
- NORTH, M.J.; COOMBS, G.H. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* (3) 293-300.
- OLIVEIRA, M.C.F., HIRATA, I.Y., CHAGAS, J.R., BOSCHCOV, P., GOMES, R.A.S., FIGUEIREDO, A.F.S. & JULIANO, L. (1992), *Anal. Biochem.* 203, 39–46.
- ROBERTSON, C.D.; COOMBS, G.H. (1992) *FEMS Microbiol Lett.* (94) 127-132.
- WILKINSON, G.N. (1961), *Biochem. J.* 80, 324–332.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos pelo suporte financeiro dado pela FAEP, FAPESP, CNPq e FAPEMIG.