

EFEITO DE ORGANOMETÁLICOS DE PALÁDIO NA ATIVIDADE DAS CISTEÍNO PROTEASES LISSOSSOMAS CATEPSINAS B E L.

Larissa Joana Vitorino¹; Wagner Alves Judice²

1. Estudante do curso de Engenharia Química; e-mail: larissa.joana12@gmail.com
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagers@umc.br

Área do Conhecimento: **Enzimologia**

Palavras-chave: Catepsinas, cisteíno proteases, paládio, time course, inibição.

INTRODUÇÃO

Cisteíno proteases lisossomais são enzimas que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Dentre elas, temos as catepsinas B e L, que participam na progressão tumoral, metástase, também estão envolvidas no programa apoptótico em células tumorais, na morte celular programada e senescência, e no controle da proliferação e diferenciação de células (TURK *et al.*, 1996). Por suas ações deletérias, elas são interessantes alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. De modo geral, a regulação da atividade das enzimas proteolíticas ocorre por meio de inibidores de proteases, um grupo específico de moléculas, que tem a propriedade de reduzir a atividade catalítica de enzimas proteolítica (BARRETT *et al.*, 1987). Atualmente, os compostos cíclicos de paládio são potentes candidatos destaque no desenvolvimento de novas drogas metálicas antitumorais e antiparasitárias por serem complexos mais estáveis, permitindo ação eficaz em concentrações muito baixas, além de apresentarem menor toxicidade (CAIRES *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

Estudar o comportamento das catepsinas B e L recombinantes humanas frente a compostos metálicos de paládio, bem como a determinação do mecanismo de ação daqueles que apresentaram potencial inibitório sob as cisteíno proteases.

METODOLOGIA

Realizou-se a triagem em duas concentrações (10 μ M e 100 μ M) de 16 moléculas de Paládio (**Figura 1**), monitorada utilizando tampão específico em espectrofluorímetro Shimadzu RF6000 nos λ_{Ex} =360nm e λ_{Em} =480nm utilizando como sonda fluorogênica Z-FR-MCA, na ausência e presença dos compostos. Para a determinação do potencial inibitório IC₅₀ e do mecanismo Time Course, utilizou-se concentrações crescentes dos compostos e os dados obtidos foram analisados no programa Grafit 5.0, sendo possível calcular K_i, k₋₃ e k₃.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de triagem de inibição da catepsina B pelos compostos na concentração de 10 μ M apenas a molécula GAFOX6 foi capaz de inibir mais de 50% da atividade enzimática. Por outro lado, na concentração de 100 μ M, os compostos CBZOX5, CBZOX6 GAFOX5 e GAFOX6 inibiram mais de 50% a atividade da catepsina B. Em relação à inibição da catepsina L, o processo de triagem permitiu averiguar que na concentração de 10 μ M, a inibição foi mais significativa, se destacando os compostos RL1, RL3, H,H e H,Ph na inibição maior que 50%.

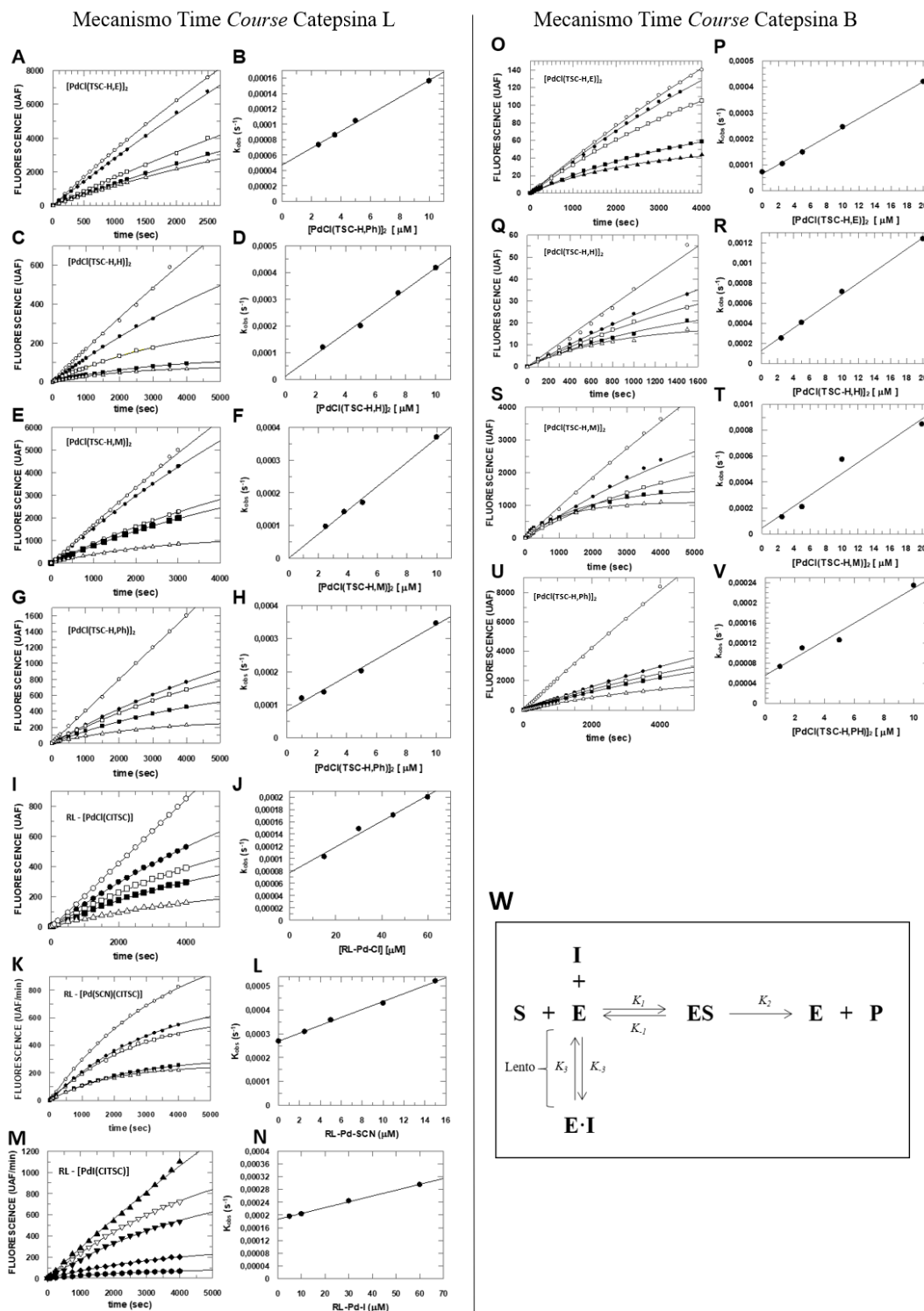
Na concentração de 100 μ M, todas as moléculas tiveram bom desempenho, com uma inibição que variou de 10 a 41,5%, exceto o composto CBZOX1.

Tabela 1: Determinação do potencial inibitório IC₅₀ nos ensaios de inibição das catepsinas B e L.

COMPOSTO	IC ₅₀ (μ M)	
	CAT B	CAT L
CBZOX1	77,40 \pm 4,29	104,53 \pm 2,43
CBZOX5	42,09 \pm 2,10	29,88 \pm 1,25
CBZOX6	19,62 \pm 0,53	42,97 \pm 0,56
GAFOX1	383,91 \pm 58,30	248,20 \pm 23,51
GAFOX2	*	76,20 \pm 6,27
GAFOX3	144,86 \pm 10,87	365,61 \pm 47,88
GAFOX4	438,07 \pm 62,76	113,32 \pm 10,76
GAFOX5	12,15 \pm 0,84	34,39 \pm 0,69
GAFOX6	45,67 \pm 3,59	38,85 \pm 0,35
RL1	*	4,12 \pm 0,33
RL2	*	4,34 \pm 0,18
RL3	*	3,62 \pm 0,14
H,H	45,45 \pm 2,65	8,86 \pm 0,35
H,M	126,40 \pm 9,46	7,46 \pm 0,06
H,E	180,61 \pm 23,62	29,65 \pm 3,60
H,Ph	202,49 \pm 4,64	12,88 \pm 3,00

Os valores de IC₅₀ variaram de 12,15 μ M a 438,07 μ M para a catepsina B e 3,62 μ M e 365,61 μ M para a catepsina L, contudo, apenas as moléculas CBZOX6 e GAFOX5 foram as mais potentes na inibição da catepsina B com valores de IC₅₀ de 19,62 μ M e 12,15 μ M, respectivamente. Para a catepsina L, é possível observar que os compostos foram mais potentes na inibição. Para os compostos que mais se destacaram, foram feitos ensaios de mecanismo *Time Course* para determinar o tipo de mecanismo dos compostos. O mecanismo do tipo *slow-binding* é um processo que depende do tempo (*time-dependent*), onde os inibidores se ligam à enzima e se dissociam lentamente devido a essa forte ligação. Segundo a literatura, isso ocorre pois há uma mudança na estrutura da enzima, ou por uma ligação covalente reversível, ou pela baixa concentração de inibidor durante o ensaio (SIMON; SMITH, 2005). Sabe-se que para que haja um mecanismo do tipo *slow-binding* a ligação entre enzima e inibidor deve ser lenta, mas é necessário que ocorra reação inversa da mesma maneira. Isso é observado a partir das variáveis k_3 e k_{-3} , constantes de associação e dissociação entre enzima e inibidor, que para este tipo de mecanismo devem ter valores baixos, originando baixos valores de K_i (COPELAND, 2000). É possível evidenciar o bom desempenho dos compostos H,M e H,H para a catepsina B, com valores de $0,41 \pm 0,06\mu$ M e $0,833 \pm 0,023\mu$ M de K_i , respectivamente. Para a catepsina L, os compostos H,E e H,Ph apresentaram excelentes valores de K_i abaixo de 1 μ M, e o composto RL3, menor eficiência de inibição, com um alto valor de K_i . Os compostos H,H e H,M, devido aos valores extremamente baixos de K_i , demonstram grande tendência para uma inibição irreversível, porém são necessárias outras análises.

Figura 1: Mecanismo Time Course para as catepsinas B e L.



Mecanismo de Inibição para os compostos de Paládio.

A-C-E-G-I-K-M-O-Q-S-U: Gráfico de Fluorescência em função do Tempo.

B-D-F-H-J-L-N-P-R-T-V: Gráfico de K_{obs} em função do [composto].

W: Mecanismo de Inibição das catepsinas B e L proposto para os compostos

Tabela 2: Valores de k_{-3} , k_3 e K_i para as catepsinas B e L.

COMPOSTO	Cat B			Cat L		
	k_{-3} ($\times 10^{-4} s^{-1}$)	k_3 ($\times 10^{-4} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	K_i (μM)	k_{-3} ($\times 10^{-4} s^{-1}$)	k_3 ($\times 10^{-4} \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	K_i (μM)
[PdCl(TSC-H,H)] ₂	1,249±0,189	1,5±0,4	0,833±0,023	0,2465±0,1275	3,198±0,155	0,077±0,04
[PdCl(TSC-H,M)] ₂	0,46±0,17	1,13±0,18	0,41±0,06	0,0038±0,1132	3,062±0,157	0,0012±0,0001
[PdCl(TSC-H,E)] ₂	0,6023±0,0357	0,49±0,01	1,23±0,07	0,4703±0,0208	0,92±0,03	0,51±0,02
[PdCl(TSC-H,Ph)] ₂	0,558±0,15	0,469±0,06	1,189±0,4	0,82±0,1	2,2±0,2	0,37±0,03
RL-[PdCl(CITSC)]	*	*	*	0,77±0,092	0,175±0,018	4,41±0,35
RL-[PdI(CITSC)]	*	*	*	2,69±0,0387	1,39±0,04	1,93±0,18
RL-[Pd(SCN)(CITSC)]	*	*	*	1,86±0,02	0,153±0,005	12,15±1,1

CONCLUSÃO

Mediante os dados de triagem obtidos, foi possível analisar o composto que mais se destacou com bom potencial inibitório em baixa concentração foi o GAFOX 6 para a catepsina B. Em altas concentrações, os compostos CBZOX5 e CBZOX6, GAFOX5 e GAFOX6 tiveram bom desempenho para esta enzima. Já para a catepsina L, os resultados foram mais significativos, já que foi possível observar bons resultados tanto em baixas quanto em altas concentrações para grande parte dos compostos. Com os resultados dos ensaios de inibição IC_{50} feitos em seguida, os melhores resultados foram para a catepsina L, e isso possivelmente ocorreu devido à grande diferença molecular entre as catepsinas B e L, pois a primeira tem uma alça de oclusão, ausente na catepsina L. As classes de compostos que se destacaram foram RL - [Pd(R)(CITSC)] e [PdCl(TSC-R)]₂. A partir destes dados foi possível estabelecer o tipo de mecanismo dos compostos selecionados pelo ensaio de mecanismo *Time Course*, e determinou-se que os todos os compostos apresentaram inibição reversível competitiva do tipo *slow-binding*, devido aos baixos valores de K_i e das constantes microscópicas k_{-3} e k_3 , concluindo-se que a associação e dissociação entre enzima-inibidor ocorre de maneira lenta.

REFERÊNCIAS

- BARRET, A.J. The cystatins, a new class of protease inhibitors. **Trends in Biochemical Science**, v. 12, p. 193-196, 1987.
- 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**, v. 22, p. 329-334, 1999.
- JUDICE, W. A. Obtenção, purificação e estudos de especificidade de cruzaína recombinante. 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, 2000.
- TURK, D.; PODOBNIK, M.; KUHELJ, R.; DOLINAR, M.; TURK, V. Crystalstructures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. **FEBS Lett.**, v. 384, p. 211–214, 1996.