

Avaliação do Mecanismo de Inibição Não-Específica na Descoberta de Inibidores Enzimáticos a Partir de Produtos Naturais

Aderson Zottis(PG),^{1,*} Maria G. V. Silva (PQ),² Glaucius Oliva (PQ),¹
Carlos A. Montanari (PQ),³ Adriano D. Andricopulo¹ (PQ)

(*zottisad@if.sc.usp.br)

¹Laboratório de Química Medicinal e Computacional – LQMC, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – CBME, Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo. ²Laboratório de Produtos Naturais – Universidade Federal do Ceará. ³Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais – NEQUIME–PN, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo

Palavras Chave: Ensaio enzimático, Inibidores não-específicos, Produtos naturais, Triton X-100.

Introdução

A triagem biológica em larga escala é um dos métodos mais importantes na identificação de novos compostos bioativos para o desenvolvimento de candidatos a fármacos. Esta técnica se baseia na avaliação de um número elevado de moléculas contra um receptor ou enzima-alvo, de maneira rápida e eficaz. Um problema com as triagens desta natureza, em particular envolvendo produtos de origem natural e outras moléculas sintéticas complexas, é que muitos compostos que não possuem especificidade pelo alvo acabam sendo selecionados. Muitos destes compostos são conhecidos na literatura por inibirem um número considerável de alvos. Este panorama é de grande importância, pois moléculas nesta categoria podem apresentar uma série de propriedades inapropriadas para um fármaco, além de possuírem efeitos adversos graves. Por isso, esses compostos “aparentemente” bioativos são classificados como “promíscuos” e devem ser descartados de novas avaliações. No presente trabalho, nosso grupo demonstra uma evolução importante na avaliação de um possível mecanismo de agregação levando a inibição promíscua (não-específica). Para estes estudos, selecionamos inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*, alvo molecular importante no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antichagásicos.¹

Resultados e Discussão

Vários compostos de origem natural descritos na literatura, outrora potenciais candidatos a fármacos, apresentam mecanismo de inibição enzimática não-específico.² Entre as características deste mecanismo temos a ocorrência de inibição tempo-dependente, curvas de inibição acentuadas, sensibilidade à concentração da enzima e força iônica, além da diminuição da inibição observada na presença de determinados peptídeos e tensoativos.³ Neste trabalho avaliamos três produtos naturais identificados como inibidores da enzima GAPDH de *T. cruzi*, a quercetina ($IC_{50} = 142 \pm 13 \mu M$), a

mangiferina ($IC_{50} = 149 \pm 18 \mu M$), e otilirósido ($IC_{50} = 46 \pm 7 \mu M$). No método de ensaio para avaliação de inibição promíscua foi empregado o tensoativo Triton X-100, que atua como inibidor da formação de agregados no meio de reação. Após a realização de vários experimentos com a adição deste componente à mistura reacional, na concentração de 0,01% v/v não foi verificada qualquer interferência na atividade enzimática da GAPDH de *T. cruzi*. Ou seja, os valores de IC_{50} permaneceram na faixa limite de 10% de erro estimado da mediada. As análises foram realizadas em duplicata, monitorando-se a reação logo após adição dos componentes com e sem a presença de Triton X 100; e então, após a incubação dos compostos com a enzima nos tempos de 5 e 10 minutos. A realização destes experimentos foi de grande valor para descartar a ocorrência de inibição não-específica, onde as moléculas agregam-se em grandes partículas em solução. Portanto, os resultados demonstram que três compostos selecionados para estes estudos são inibidores da enzima GAPDH de *T. cruzi* nas condições padrões de ensaio de cinética enzimática.

Conclusões

Os compostos analisados, embora apresentem inibição promíscua frente a outras enzimas, não demonstraram este mecanismo na inibição da GAPDH de *T. cruzi*. É de extrema importância no processo de planejamento de fármacos a identificação rápida e segura da presença de inibição não-específica, para que moléculas candidatas possam ser descartadas, evitando assim perdas desnecessárias de recursos e esforços.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq

¹ Verlinde, C. L. M. J.; Hannaert, V.; Blonski, C.; Willson, M; Périé, J. J.; Fothergill-Gilmore, L. A.; Opperdoes, F. R.; Gelb, M.H.; Hol, W. G. J. e Michels, P. A. M. *Drug Resist. Updat.* **2001**, *4* (1), 50.

² Salem, M. M. e Werbovetz, K. A. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (21), 2571

³ McGovern, S. L.; Helfand, B. T.; Feng, B. e Schoichet, B. K. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4265.