

Caracterização do Mecanismo de ação de Inibidores da Cruzaína Seleccionados por *Virtual Screening*

Erika Piccirillo¹ (IC), Alberto Malvezzi¹ (PQ), Leandro de Rezende¹ (TC), Antonia T-do Amaral^{1*} (PQ)

¹Depto de Química Fundamental, Instituto de Química, USP, SP, C.P. 06077;

05513-970 São Paulo, Brasil. *atdamara@iq.usp.br

Palavras Chave: *Virtual Screening*, Cruzaína, Inibidor de protease, Doença de Chagas

Introdução

Proteases são enzima que catalisam reações de hidrólise da ligação peptídica. Essas enzimas estão presentes em todos os seres vivos e participam de diversos processos fisiológicos¹. Devido a sua importância, as proteases são alvos de interesse para o desenvolvimento de compostos bioativos. A cruzaína é uma protease reconhecida como um alvo válido para o desenvolvimento de terapia anti-chagásica². A doença de Chagas é endêmica no Brasil e a deficiência no tratamento, devido ao limitado interesse na pesquisa, motivam a busca por novos compostos anti-chagásicos. Recentemente, em nosso laboratório, foi desenvolvido e validado um modelo de *virtual screening* de inibidores da cruzaína. Este modelo foi aplicado à biblioteca de compostos ZINC e foram selecionados 55 compostos, dentre os quais 19 foram adquiridos e testados como inibidores da cruzaína. Um destes, o composto **1**, apresentou um $K_i = 21 \mu\text{M}$ quando testado segundo o modelo de inibição de *Tight-Binding*. Dando continuidade a esse trabalho, buscamos determinar e caracterizar o mecanismo de inibição do composto **1**, em especial considerando a inibição em função do tempo e a possibilidade de uma inibição covalente.

Procedimento Experimental

Seguindo-se protocolo da literatura⁴, em uma solução de tampão fosfato (50 mM), pH 6,50, com EDTA (2,5 mM), DDT (45,4 μM) e Triton-X100 (0,01% v/v), seis diferentes concentrações do composto **1** (variando de 10,9 μM a 139,5 μM) foram, respectivamente, incubadas com cruzaína (0,99 μM). Nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos, foram retiradas alíquotas desta solução inicial e a atividade enzimática foi medida fluorimetricamente com a adição de substrato Bz-FR-MCA (0,5 μM), em um fluorímetro Hitachi modelo F-4500, com agitação magnética e temperatura controlada de 37°C, EX 380 nm e EM 460 nm.

Resultados e Discussão

Em todas as concentrações do inibidor testadas, a atividade enzimática diminuiu proporcionalmente

com o aumento do tempo de incubação e, em todos os casos foi observada uma inibição de pelo menos 50% da atividade enzimática inicial. Os valores de inibição da atividade enzimática foram registrados como porcentagens de atividade em relação a um controle, sem inibidor, garantindo-se, desta forma, que a perda da atividade da enzima seja proveniente da atividade do inibidor e não de variações nas condições experimentais. A partir dos gráficos do logaritmo da porcentagem de atividade enzimática em função do tempo de incubação foram extraídos os valores de meia-vida de inibição da enzima pelo composto **1**. Finalmente, os valores de K_i (74,9 μM) e k_{inat} (0,016 min^{-1}) foram extraídos do gráfico dos valores de $T_{1/2}$ em função do inverso da concentração de inibidor⁴ (Figura 1).

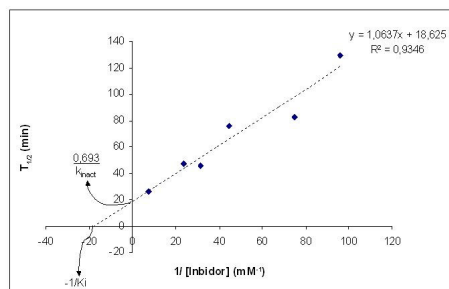


Figura 1. Gráfico dos valores de meia-vida de inibição da cruzaína em função do inverso da concentração do composto **1**, de onde são extraídos os valores de K_i e k_{inat}

Conclusões

O valor de $K_i = 74,9 \mu\text{M}$ do composto **1** obtido com a inibição em função do tempo está de acordo com o valor observado anteriormente (21 μM). Adicionalmente, foi possível calcular a constante de velocidade da inibição $k_{\text{inat}} = 0,016 \text{ min}^{-1}$.

Agradecimentos

Suporte financeiro: FAPESP, CAPES-PNPD, CNPq. A cruzaína foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Luiz Juliano (UNIFESP-SP). Agradecemos ao Prof. Dr. Rodrigo Cunha (UFABC) pela ajuda com os ensaios enzimáticos.

¹ Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, O.D., James, K.E., *Chemical Reviews*, 102, 4639 - 4750, 2002

² Cazzulo, J.J., Stoka, V., Turk, V., *Current Pharmaceutical Design*, 7, 1143-1156, 2001.

³ Malvezzi, A., Tese de Doutorado, IQ-USP, 2008.

⁴ Silverman, R.B., *Methods of Enzymology*, 240 - 283, 1995.