

Inibição *time-dependent* frente à Cruzaína de compostos selecionados 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*, *Inibição time-dependent*.

Introdução

A cruzaína é uma protease reconhecida como um alvo válido para o desenvolvimento de terapia anti-chagásica¹. 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 grupo de pesquisa, foi desenvolvido e validado modelo de *virtual screening* (VS) na busca de inibidores da cruzaína^{2,3}. Este modelo foi aplicado à biblioteca de compostos ZINC sendo selecionados 55 compostos, dentre os quais 19 (compostos **1** a **19**) foram adquiridos e avaliados utilizando-se modelo de inibição de *tight-binding*, considerando um mecanismo de inibição covalente³. Nas condições de inibição utilizadas, apenas o composto **1** apresentou atividade inibitória² (K_i igual a $21\mu\text{M}$). Na literatura⁴ sugere-se que inibidores covalentes podem apresentar uma cinética dependente do tempo. Desta forma neste trabalho descreve-se a inibição frente à cruzaína em função do tempo (*time-dependent*⁴), para o composto **2** selecionado pelo modelo de VS, dando continuidade ao trabalho já apresentado na 32^aRASBQ⁵ para o composto **1**.

Procedimento Experimental

Seguindo-se protocolo da literatura⁴, foram feitos para o composto **2**, testes de inibição da cruzaína, em 10 diferentes tempos de incubação (0 a 180min). Esses testes consistiram em incubar, a cruzaína ($0,57\mu\text{M}$) com 4 diferentes concentrações de **2** (variando de $0,77\mu\text{M}$ a $1,85\mu\text{M}$) numa solução tampão pH 6,50 (Na_2HPO_4 (50mM) e EDTA (2,50 mM)), DTT ($4,50\mu\text{M}$) e Triton-X100 (0,01% v/v)^{6,7} mantida à $37\pm 0,1^\circ\text{C}$. Em intervalos de 20 min, alíquotas de $20,0\mu\text{L}$ desta solução foram retiradas e adicionadas à uma cubeta contendo $975\mu\text{L}$ do tampão. A reação foi iniciada com a adição de $5,0\mu\text{L}$ de substrato Bz-FR-MCA ($100\mu\text{M}$). A reação foi seguida, pela formação de produto fluorescente. Todas as medidas foram registradas em um fluorímetro SHIMADZU modelo RF-5301 PC, ($\lambda_{\text{ex}}=370$ e $\lambda_{\text{em}}=416$), equipado com agitador magnético e banho termostático, ajustado para $37^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Resultados e Discussão

Em todas as concentrações do composto **2** testadas, a atividade enzimática diminuiu proporcionalmente com o aumento do tempo de incubação. Os valores de inibição da atividade enzimática foram registrados como porcentagens de atividade em relação a um controle, sem o composto **2**, garantindo-se, desta forma, que a perda da atividade da enzima seja proveniente apenas da atividade do composto. 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 inativação enzimática do composto. Desta forma, os valores de K_i ($0,67\mu\text{M}$) e de k_{inat} ($1,58 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) foram extraídos do gráfico dos valores de $t_{1/2}$ em função do inverso da concentração do composto **2**³. (Figura 1)

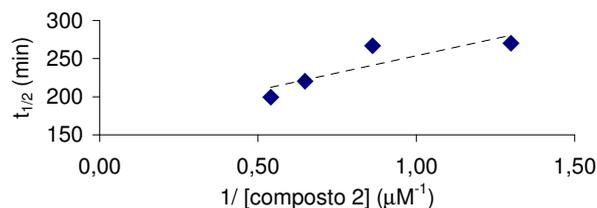


Figura 1. Gráfico dos valores de meia-vida de inativação da cruzaína em função do inverso da concentração de **2**.

Conclusões

O modelo de inibição em função do tempo permitiu a obtenção dos valores de K_i ($0,67\mu\text{M}$) e de k_{inat} ($1,58 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) para o composto **2**, valores que ainda não haviam sido observados² por *tight-binding*.

Agradecimentos

FAPESP (2008/11138-5), CAPES-PNPD (Proc. 165085), INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma (CNPq/FAPESP/MCT). Ao Prof. Dr. Luiz Juliano (UNIFESP-SP) e Prof. Dr. Rodrigo Cunha (UFABC).

¹ Cazzulo, J.J., *et al.*, *Cur Pharm Des.*, 7, 1143-1156, 2001.

² Malvezzi, A., Tese de Doutorado, IQ-USP, 2008.

³ Malvezzi, A., *et al.*, *QSAR & Comb. Sci.*, 2009, 8, 781 - 784

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

⁵ Piccirillo, E., *et al.*, 32^a RASBQ, maio 2009.

⁶ Malvezzi, A., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 350-4, 2008.

⁷ Malvezzi, A.; *et al.*, Proceedings of the International Conference on Drug Design and Discovery for Developing Countries (Trieste 3 - 5 July 2008), ICS-UNIDO publication.