Caracterização do Efeito de Moduladores com Atividade Antimitótica na Polimerização da Tubulina

Lívia B. Salum (PG),[1,*] Luiz Carlos Dias (PQ),[2] Adriano D. Andricopulo (PQ)[1]
(*liviasalum@yahoo.com.br)

[1]Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo; [2]Laboratório de Química Orgânica Sintética, Instituto de Química – UNICAMP

Palavras Chave: *câncer, polimerização da tubulina, taxol, colchicina*

Introdução

Compostos que provocam alterações na dinâmica de polimerização dos microtúbulos desencadeiam sinais bioquímicos que culminam em apoptose. A tubulina, principal constituinte dos microtúbulos, é o alvo macromolecular de fármacos anticâncer como o taxol, o taxotere, a vincristina e a vimblastina. Enquanto os dois primeiros promovem a formação dos microtúbulos, os alcalóides da vinca, assim também como a colchicina, inibem a polimerização da tubulina. No entanto, o surgimento constante de mecanismos de resistência aliado à ocorrência de reações adversas graves e propriedades farmacocinéticas inadequadas tem impulsionado a pesquisa por novas entidades químicas (NCEs) com propriedades otimizadas, que atuem tanto como inibidoras quanto promotoras da polimerização da tubulina.

Para a geração de novas moléculas bioativas qualificadas, entretanto, a integração de métodos de planejamento de química medicinal ao trabalho químico e biológico experimental é um requerimento essencial. Portanto, é necessária a utilização de um ensaio biológico padronizado para a avaliação do efeito específico dos compostos planejados sobre o processo de polimerização da tubulina. Nesse trabalho, é discutido o comportamento das curvas de polimerização da tubulina na presença de GTP e de inibidores e promotores da polimerização.

Resultados e Discussão

Os efeitos do taxol e colchicina sobre a curva de polimerização da tubulina (18 µM), na presença de GTP, foram monitorados através de mudanças na intensidade de fluorescência do sistema devido à incorporação de um marcador de fluorescência nos microtúbulos. O fluoróforo utilizado foi 4',6,diamino-2-fenilindol, que interage especificamente em uma cavidade hidrofóbica formada pelos heterodímeros de αβ-tubulina polimerizados, distinta das cavidades de interação do taxol, vincristina e colchicina, provocando aumento da intensidade de fluorescência, e não interferindo na polimerização.

Os testes foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços e observados utilizando leitor de placa. As curvas de polimerização foram acompanhadas pela emissão a 410-460 nm por um período de 60 minutos a 37º C, utilizando um comprimento de excitação de 340-360 nm.

Nas melhores condições determinadas para o ensaio, a curva de polimerização padrão apresentou as 3 fases características de formação dos microtúbulos, denominadas nucleação (I), crescimento (II) e equilíbrio estacionário (III) (Figura 1). Com a adição de taxol e colchicina (1 µM), observou-se que enquanto o taxol provocou redução na fase de nucleação e aumento na velocidade da fase de crescimento e da massa de polímero formado, a colchicina provocou efeitos exatamente inversos. Para a determinação dos parâmetros de potência biológica para o taxol (EC_{50}) e a colchicina (IC_{50}) as leituras foram realizadas após 20 minutos do progresso da reação, durante a fase de crescimento do polímero. Valores de 0,98 µM e 6,72 µM, respectivamente, foram obtidos.

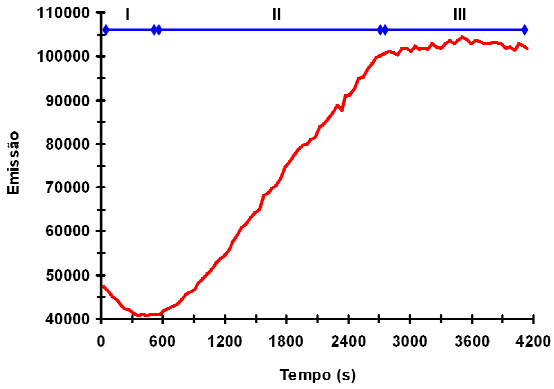

Figura 1. Curva de polimerização da tubulina

Conclusões

O ensaio apresentado demonstra-se bastante útil para a triagem biológica inicial e determinação da potência de compostos que modulam a atividade da tubulina, e será utilizado como parte das nossas estratégias de planejamento de compostos com atividade anticâncer.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP, CAPES

[1] Barron DM, Chatterjee SK, Ravindra R, Roof R, Baloglu E, Kingston DG, Bane S. *Anal Biochem* 2003, 315, 49