

## Estudo do mecanismo de inativação frente à cruzaina de um inibidor selecionado por *Virtual Screening*

Erika Piccirillo<sup>1\*</sup> (IC), Alberto Malvezzi<sup>1</sup> (PQ), Leandro de Rezende<sup>1</sup> (TC), Antonia T-do Amaral<sup>1</sup> (PQ)

<sup>1</sup>Depto de Química Fundamental, Instituto de Química, USP, SP, 5513-970 São Paulo, Brasil. \*erika@iq.usp.br

Palavras Chave: *Virtual Screening*, Cruzaina, Inibidor de protease, Doença de Chagas, Inativação Irreversível

### Introdução

A cruzaina é uma protease reconhecida como um alvo válido para o desenvolvimento de terapia anti-chagásica<sup>1</sup>. A doença de Chagas é endêmica no Brasil e há deficiência no tratamento e limitado interesse na pesquisa, motivando a busca por novos anti-chagásicos. Em nosso grupo de pesquisa, foi desenvolvido e validado um modelo de *virtual screening* (VS) na busca de inibidores da cruzaina, considerando um mecanismo de inibição covalente<sup>2,3</sup>. Este modelo foi aplicado à biblioteca de compostos ZINC, sendo adquiridos e avaliados 19 compostos (compostos **1** a **19**) utilizando-se modelo de inibição de *tight-binding*. Na literatura<sup>4</sup> sugere-se que inibidores covalentes podem apresentar uma cinética dependente do tempo. Assim, avaliou-se a atividade inibitória do composto **1** frente à cruzaina em função do tempo e observou-se que este apresenta um mecanismo de inibição dependente do tempo ( $K_i = 17,39 \mu\text{M}$  e  $k_{\text{inat}} = 9,5 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$ )<sup>5</sup>. Dando continuidade à caracterização do mecanismo de inibição já apresentado na 32<sup>a</sup> RASBQ<sup>5,6</sup>, neste trabalho, foram realizados experimentos para verificar se o inibidor **1** apresenta um mecanismo de inativação irreversível, ou não, frente à cruzaina.

### Resultados e Discussão

Seguindo-se protocolo da literatura<sup>7</sup>, no qual se introduziram algumas modificações, foram feitos experimentos para verificar se o mecanismo de inativação do inibidor **1** é irreversível, ou não. Estes consistiram em incubar em uma solução a cruzaina (0,17 $\mu\text{M}$ ) com o inibidor **1** (648,77 $\mu\text{M}$ ) numa solução tampão pH 6,30 [NaCl (400mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100mM) e EDTA (10 mM)], DTT (5mM) e Triton-X100 (0,01% v/v) mantida à 37 $\pm$ 0,1 $^\circ\text{C}$  com agitação, durante 90 min. Inicialmente, uma alíquota de 30 $\mu\text{L}$  da solução foi retirada, para medida da atividade enzimática, e a reação foi interrompida. A alíquota de 30 $\mu\text{L}$  da solução foi adicionada a uma cubeta contendo 965 $\mu\text{L}$  do tampão. A reação foi iniciada com a adição de 5,0 $\mu\text{L}$  de substrato Bz-FR-MCA (100 $\mu\text{M}$ ) e seguida pela formação de produto fluorescente. Todas as medidas foram registradas em um fluorímetro SHIMADZU modelo RF-5301 PC,  $\lambda_{\text{ex}}=380$  e  $\lambda_{\text{em}}=460$ , equipado com agitador magnético e banho termostaticado, ajustado para 37 $^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ . A seguir, o inibidor **1** foi retirado da solução através de repetidas etapas de lavagem e

de filtração por centrifugação em um filtro Microcon YM 10, *cutoff* de 10kDa. Os valores da atividade da cruzaina inicialmente obtidos para a solução contendo o inibidor **1** foram comparados com os valores obtidos após sua retirada desta solução, verificando-se ao mesmo tempo se ocorreu, ou não, um aumento significativo no valor da atividade. Os valores da velocidade inicial de formação do produto ( $v_0$ ) foram utilizados como parâmetro da medida da atividade enzimática. Nestes experimentos, a perda de atividade enzimática, inerente ao experimento, foi considerada utilizando-se solução controle, sem o inibidor **1**, que foi mantida as mesmas condições experimentais. Os valores de  $v_0$  obtidos antes e após as etapas de lavagem e de filtração para as soluções com e sem o inibidor **1**, estão, respectivamente, apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de atividade da cruzaina ( $v_0$  [UFA/s]) obtidos antes e após as etapas de lavagem e de filtração para as soluções preparadas com e sem o inibidor **1**.

Lavagem e filtração	Com inibidor	Sem inibidor
Antes	4,03	9,37
Depois	4,34	8,19

Os valores de  $v_0$  obtidos antes e depois das etapas de lavagem e de filtração, para as soluções com e sem inibidor **1** foram idênticos, considerando-se o erro experimental de 10%, aceito para este tipo de experimento. Os valores de  $v_0$  obtidos para o teste com inibidor **1** mostraram que após sua retirada não se observou aumento significativo na atividade da cruzaina, como seria esperado para um inibidor reversível. Analisando-se o teste controle feito sem o inibidor **1** foi observado que as etapas de lavagem e de filtração não acarretaram uma diminuição significativa na atividade da cruzaina.

### Conclusões

Verificou-se que o inibidor **1** apresenta mecanismo de inativação irreversível frente à cruzaina.

### 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 ao aluno Rafael Queiroz (IQUSP).

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

<sup>2</sup> Malvezzi, A., *Tese de Doutorado*, IQ-USP, 2008.

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

<sup>4</sup> Silverman, R.B., *Methods of Enzymology*, 240 - 283, 1995.

<sup>5</sup> Piccirillo, E., *et al.*, 32<sup>a</sup> RASBQ, maio 2009, painel MD-71.

<sup>6</sup> Piccirillo, E., *et al.*, 5<sup>th</sup> BrazMedChem, nov 2010, painel 72.

<sup>7</sup> Lee, B., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 48, 7400-7410, 2005