

Estudos da seletividade frente à cruzaina de um composto selecionado por Virtual Screening

Erika Piccirillo^{1*} (PG), Alberto Malvezzi¹ (PQ), Leandro de Rezende¹ (TC), Antonia T-do Amaral¹ (PQ)

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

Palavras Chave: Doença de Chagas, Cruzaina, Catepsina L humana, Inibidor de protease, Seletividade.

Introdução

A doença de Chagas é endêmica na América Latina e há deficiência no tratamento e limitado interesse na pesquisa, motivando a busca por antichagásicos¹. No grupo de pesquisa^{2,3}, o composto **1** foi selecionado por um modelo de VS como potencial inibidor frente à cruzaina, protease reconhecida como alvo para o desenvolvimento de novos antichagásicos¹. Ainda, para **1** foi observada inibição dependente do tempo ($K_i = 18,81 \pm 0,7 \mu\text{M}$ e $k_{\text{in}} = 9,5 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$)⁴ e inativação irreversível⁵, todavia, ainda não havia sido estudados aspectos relacionados ao grau de reatividade de **1** frente a grupos SH bem como à seletividade frente à cruzaina, relativamente a catepsina L humana. Assim, neste trabalho estes aspectos foram estudados, com o objetivo de melhor compreender o mecanismo de inibição do composto **1**, visando fornecer subsídios que permitam otimizar tanto a atividade inibitória bem como a seletividade de **1**.

Resultados e Discussão

Métodos cromatográficos e espectrométricos foram utilizados no estudo do grau de reatividade e da seletividade de **1**. A reatividade de **1** frente a grupos -SH, foi estudada usando protocolos da literatura^{5,6}. No primeiro, seguiu-se a reação entre grupos -SH e DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico). Os resultados inicialmente obtidos indicaram que para **1** nenhuma reatividade frente a grupos -SH foi observada, nas condições utilizadas (10min de reação). Considerando-se que o composto apresenta inibição dependente do tempo⁴, tentou-se avaliar o efeito do tempo. No entanto, foi constatado, que para tempos de reação maiores, não foi observado consumo de DTNB, sugerindo que as cisteínas poderiam ter oxidado durante o tempo de reação, devido a impossibilidade de usar agente redutor. Assim, fez-se necessário utilizar um segundo protocolo para se estudar o grau de reatividade de **1** frente a grupos -SH, no qual o meio redutor fosse mantido e o tempo de reação pudesse ser aumentado. Neste procedimento, o grau de reatividade de **1** frente à SH foi avaliado através da reação de **1** com cisteína, observando-se, por CLAE, o consumo de **1** na presença de cisteína bem como se caracterizando, parcialmente, os produtos formados nesta reação. Ainda, foram utilizados dois diferentes pHs (6,3 e 10,0), visando-se obter soluções com cisteína nas formas de tiol e de tiolato

e tempo de reação aumentado para 20 horas. Os resultados indicam que **1** apresenta baixo grau de reatividade frente à grupos -SH e que este depende do grau de protonação do grupo -SH (favorecido por tiolato). Adicionalmente, foi realizado o estudo de seletividade frente à cruzaina, foi realizado avaliando sua inibição frente à catepsina L humana (45% de identidade com a cruzaina). Neste estudo, a determinação do valor de K_i de **1** frente à catepsina L humana foi feita empregando-se protocolo análogo ao utilizado nos teste de inibição de **1** frente à cruzaina⁴. Os valores de K_i e de k_{in} de **1** frente à catepsina L humana foram obtidos sendo estes iguais a $132,8 \pm 43,6 \mu\text{M}$ e a $0,41 \text{min}^{-1}$, respectivamente.

Conclusões

Neste trabalho foi possível concluir que o composto **1** apresenta uma baixa reatividade frente à grupos -SH não proteicos e que esta depende do estado de protonação dos grupos -SH livres, favorecido por grupos -S⁻. Sabendo-se que tiolatos são melhores nucleófilos que tióis, a preferência por tiolato sugere que do ponto de vista mecanístico a reação entre **1** e a cisteína possa ocorrer via ataque nucleofílico. Ainda, estes resultados, juntamente com nossas observações anteriores^(4,5) (mecanismo irreversível e dependente do tempo), sugerem que a inibição de **1** frente à cruzaina possa ocorrer através de formação de uma ligação covalente. Adicionalmente, foi observado que **1** apresenta atividade inibitória frente à catepsina L ($K_i = 132,8 \pm 43,6 \mu\text{M}$). Os valores de K_i obtidos para **1** frente à catepsina L humana e frente à cruzaina foram iguais a $132,8 \pm 43,6 \mu\text{M}$ e $18,81 \pm 0,7 \mu\text{M}$, respectivamente, indicando que embora estejam na mesma faixa de grandeza (μM) **1** apresenta alguma seletividade frente à cruzaina relativamente a catepsina L humana.

Agradecimentos

FAPESP (2008/11138-5), INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma (CNPq/FAPESP/MCT). Ao Prof. Dr. Luiz Juliano (UNIFESP-SP) e aos alunos Rafael Queiroz (IQUSP) e Mario Augusto Isidoro (UNIFESP-SP).

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 Piccirillo, E., et al., *32^a RASBQ*, maio 2009, painel MD-71.

⁵ Piccirillo, E., et al., *5th BrazMedChem*, nov 2010, painel 72.

⁶ Ellman, G. L., *Arch Biochem Biophys*, 82,70-77, 1959.

⁷ Vaz, S.M., et al, *Arch Biochem Biophys*, 484, 127-133, 2009.