

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE AFINIDADE DE INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES

Beatriz Siqueira Ho

Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo

beasho@usp.br

Objetivos

O presente trabalho visa avaliar a afinidade entre a cruzaina e uma série de inibidores, sintetizados pelo grupo de Química Medicinal e Biológica (NEQUIMED) do Instituto de Química de São Carlos. Para tal propósito, foram determinados os potenciais inibitórios destes compostos, onde os mais eficazes foram destacados como possíveis candidatos para estudos futuros. Além disso, foi realizado um estudo adicional sobre a estabilidade da cruzaina expressada no laboratório e a importância do DTT (ditiotretol, agente redutor) na manutenção da atividade enzimática.

Métodos e Procedimentos

O projeto foi desenvolvido através da aplicação da metodologia descrita nas seguintes etapas:

1. Expressão da proteína alvo em *E. coli*;
2. Purificação da cruzaina mediante a combinação de diferentes técnicas que abrangem: o isolamento inicial (lise por sonicação), clarificação (centrifugação) da solução de proteína seguida de uma etapa de diálise e isolamento da proteína por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados em nível de bancada;
3. Ativação da cruzaina utilizando-se o agente redutor β -mercaptoetanol;
4. Realização de ensaios de cinética e inibição enzimática, a fim determinar as constantes de Michaelis (K_M) e de inibição (K_i);

5. Tratamento dos resultados através de softwares específicos e consequente avaliação dos valores de pK_i para determinação do potencial inibitório de cada composto. E por fim, estudo da estabilidade da proteína e importância do DTT em reações enzimáticas.

Resultados

Os ensaios de cinética enzimática geraram resultados condizentes aos descritos em literatura, com constante de Michaelis da cruzaina variando de 1 a 5,2 μM . Sob o ponto de vista prático, os baixos valores de K_M indicaram uma alta afinidade da cruzaina pelo substrato e uma excelente taxa de conversão deste em produto, como demonstrado pelos valores de k_{cat} e eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) que estão de acordo com os parâmetros descritos na base de dados BRENDA.

Tabela 1. Resultados obtidos de K_M e V_{max} para a cruzaina através da equação de Michaelis-Menten

K_M (μM)	$2,9 \pm 0,1$
V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$14,4 \pm 0,1$
k_{cat} (s^{-1})	5,44
k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$2,58 \times 10^6$

*Resultados calculados através da média de duas medidas

Através da variação de alguns parâmetros – como pH, temperatura e concentração de DTT – dos ensaios de inibição enzimática foram estudadas a estabilidade da

cruzaína expressada e a importância do DTT na manutenção da atividade enzimática.

Considerando-se que os valores ideais de pK_i do composto padrão (Neq0570) variam dentro de uma faixa de 6,5 a 6,7, averiguou-se que a cruzaína apresenta atividade ótima sob baixa temperatura e em meio levemente ácido. Assim como, foi demonstrado que a ativação da enzima ocorre de maneira mais eficiente sob concentrações de DTT em torno de 5 mM, onde o agente apresenta efetivamente a capacidade de reduzir a oxidação da amostra de proteína, mantendo a atividade enzimática específica.

Tabela 2. Resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da cruzaína variando-se o pH do tampão e temperatura de ativação

Parâmetros	pK_i
Banho de gelo ($\cong 0^\circ\text{C}$)	$6,6 \pm 0,01$
25°	$6,4 \pm 0,01$
pH 5,5	$6,6 \pm 0,01$
pH 7,5	$5,3 \pm 0,19$

A partir dos resultados obtidos para os ensaios de inibição enzimática de cruzaína com os inibidores selecionados para o projeto, foram calculadas as constantes de inibição que, em seguida, foram convertidas em termos de logaritmo (pK_i). Determinados compostos testados frente a cruzaína e seus respectivos valores de pK_i e porcentagem de inibição estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Determinados compostos testados e seus respectivos valores de pK_i e % inibição

Composto	pK_i	% Inibição
Neq0570	$6,5 \pm 0,01$	-
Neq1136	$7,8 \pm 0,03$	-
Neq1141	$8,5 \pm 0,02$	-
Neq1164	$4,7 \pm 0,02$	-
Neq1170	-	> 95%

*Os compostos estudados foram sintetizados pelo grupo NEQUIMED/IQSC/USP

Além disso, foi realizado um estudo da relação estrutura-atividade de uma série de inibidores. No qual, através de uma abordagem por MMPA (do inglês, *Matched Molecular Pair Analysis*) foi possível correlacionar a

modificação estrutural efetuada no composto e a diferença de afinidade dada por ΔpK_i . Tal estudo forneceu informações significativas sobre como a alteração de determinados grupos funcionais em certos compostos podem culminar em ganho ou perda de afinidade.

Conclusões

O trabalho forneceu informações quantitativas sobre os diferentes inibidores avaliados, sendo que o Neq1141 apresentou alta potência contra a cruzaína. Além disso, os parâmetros cinéticos obtidos comprovam a atividade específica da cruzaína. Enquanto, os experimentos adicionais revelaram aspectos interessantes quanto a estabilidade da enzima expressada no projeto e contribuição do DTT na manutenção desta estabilidade.

Tais informações são relevantes para a pesquisa de fármacos baseados na inibição de enzimas, como a cruzaína – principal cisteíno protease presente no *T. cruzi* (agente etiológico da Doença de Chagas), possuindo um papel crucial no ciclo de vida do parasito. Sendo assim, um alvo muito promissor para o desenvolvimento de novos fármacos que atendam às necessidades do tratamento desta doença e apresentem uma melhor tolerância que o Benzonidazol, que atualmente é o único medicamento disponível para o tratamento no Brasil.

Referências Bibliográficas

- [1] MONTANARI, CA; et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrilebased cysteine protease inhibitors. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017.11(2): p. e0005343
- [2] SAJID, M; et al. (2011) Cruzain: the path from target validation to the clinic. *Adv Exp Med Biol.*, 712:100-15.
- [3] BRENDA Enzyme Database. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/>.
- [4] CIANNI, L; et al. Can Cysteine Protease Cross-Class Inhibitors Achieve Selectivity? *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 10497-105
- [5] VERMA, S; et al. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front. Pharmacol.*, 7:107, 2016.