

INTRODUÇÃO

A Adenosina Quinase (ADK) é uma enzima importante (E.C. 2.7.1.20), cuja ação pode estar relacionada a diversas doenças, tais como inflamações, derrame, infarto, entre outras. Portanto, a inibição de sua atividade é de grande importância. Na tentativa de inibi-la, buscou-se compostos orgânicos nos quais houvesse uma acentuada capacidade inibitória, quando comparado aos inibidores já existentes. Desse modo, derivados de 4-anilino-quinazolininas mostram-se alvos promissores.

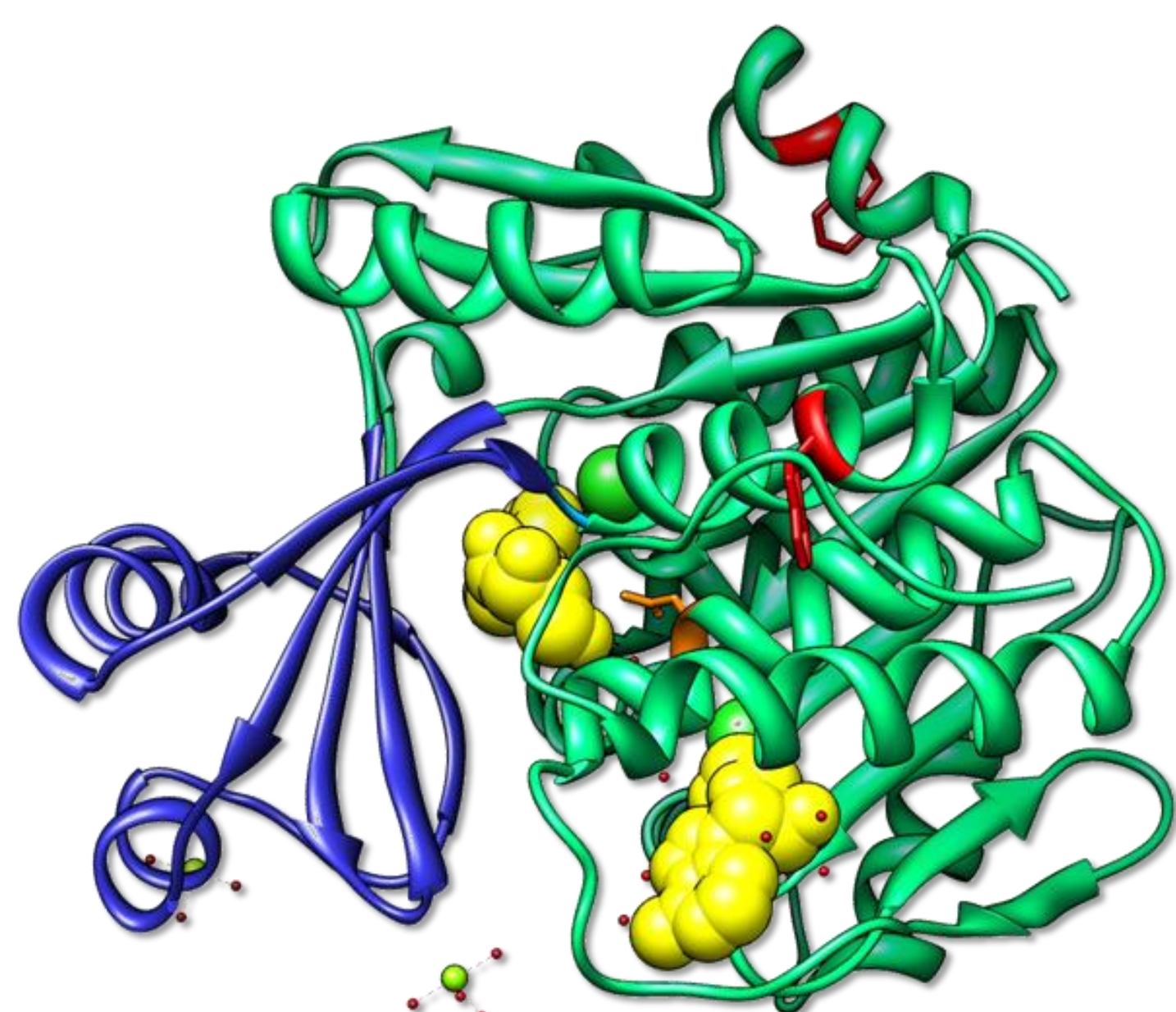


Figura 1 – Moléculas de ADK (verde) e Adenosina (ADO).

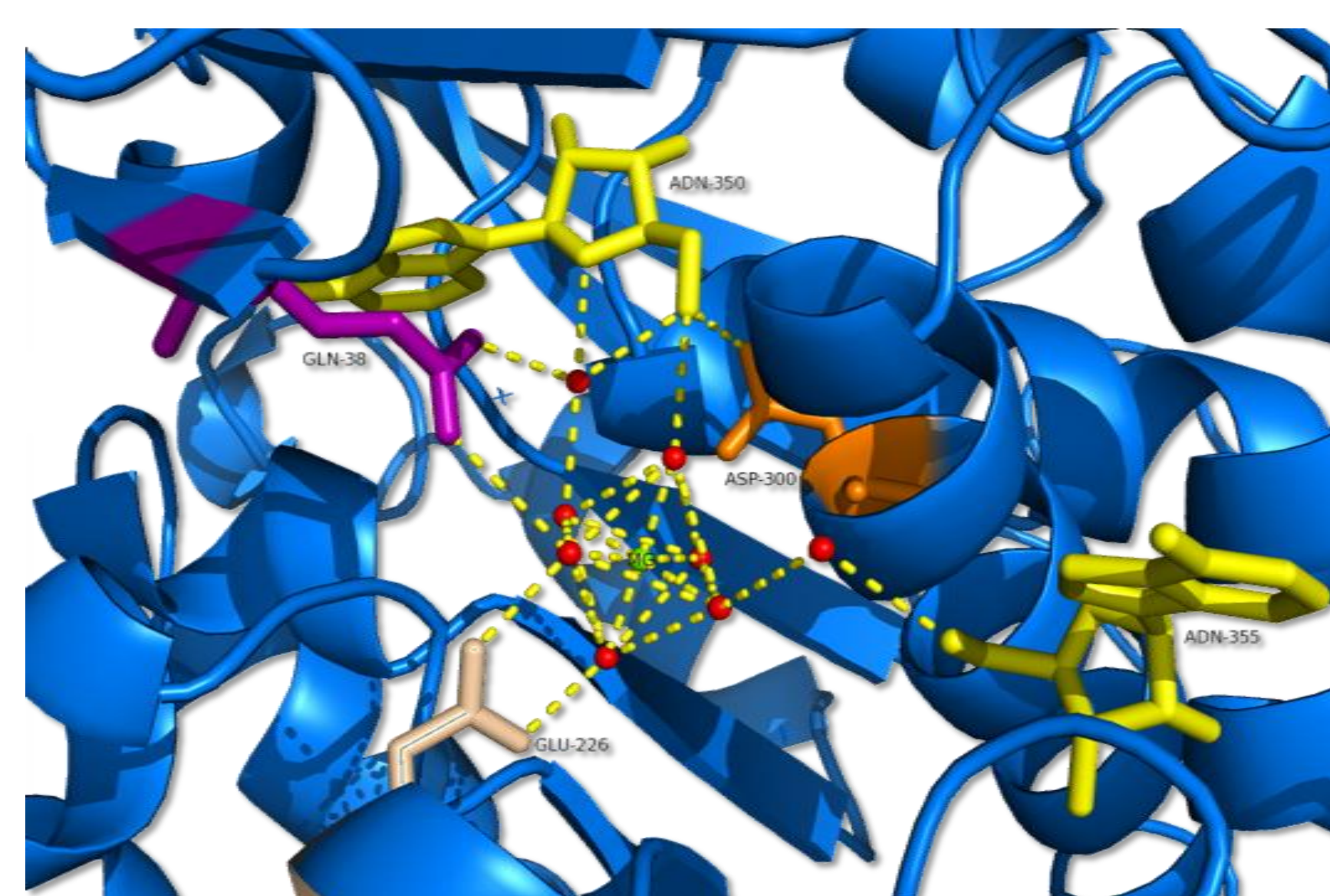


Figura 2 – Sítio de ligação da AK, resíduo catalítico Asp₃₀₀ (laranja) e íons de Mg²⁺.

OBJETIVOS

O objetivo do projeto envolve a síntese e caracterização da classe de compostos de derivados de 4-anilinoquinazolininas, bem como a investigação de suas interações com a ADK. O potencial inibitório é verificado pela supressão de fluorescência, determinando-se as constantes físico-químicas, como por exemplo a constante de dissociação (K_d).

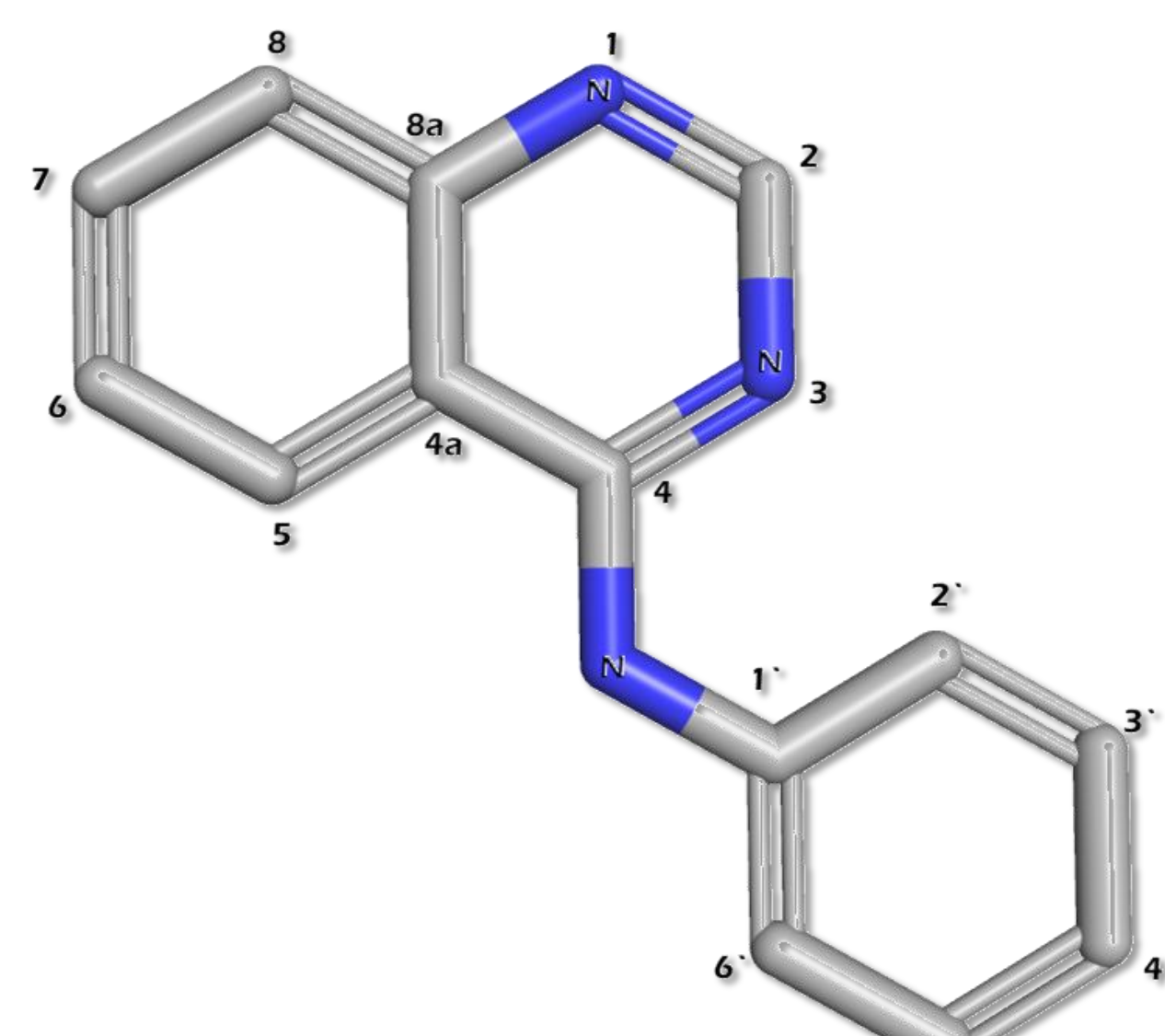
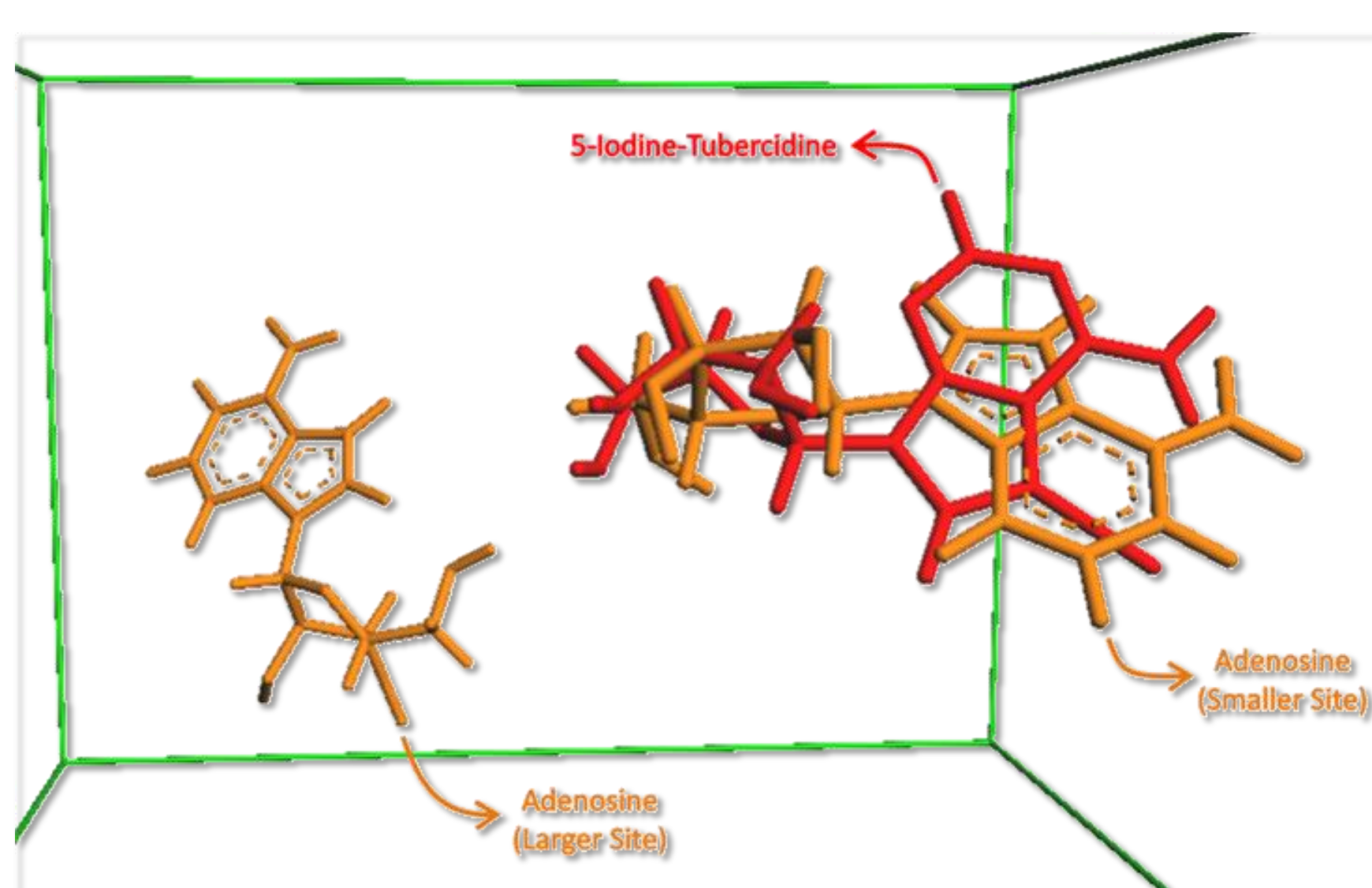


Figura 3 – Estudo in silico da 5-iodo-tubercidina frente aos substratos naturais (ADO).

Figura 4 – Estrutura química da 4-anilinoquinazolinina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de fluorescência foram conduzidos em espectrofluorímetro Varian Eclipse, janela de 300-500 nm e fendas de 5 nm; as titulações da enzima (2,0 μM) foram realizadas utilizando-se soluções dos compostos em DMSO, em incrementos de 0,5 μL, até saturação. Os ensaios baseiam-se na fluorescência intrínseca do triptofano, com λ_{exc} = 290 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada diminuição na intensidade de fluorescência com o aumento da concentração dos compostos. Os máximos de fluorescência apresentaram deslocamento para o vermelho, sugerindo mudanças conformacionais protéicas.

A constante de dissociação procurada foi então obtida pela fórmula abaixo, baseada na regressão não-linear de Stern-Volmer, como mostram as figuras que seguem:

$$Q = (Q_{max} \cdot C) / (K_d + C)$$

A

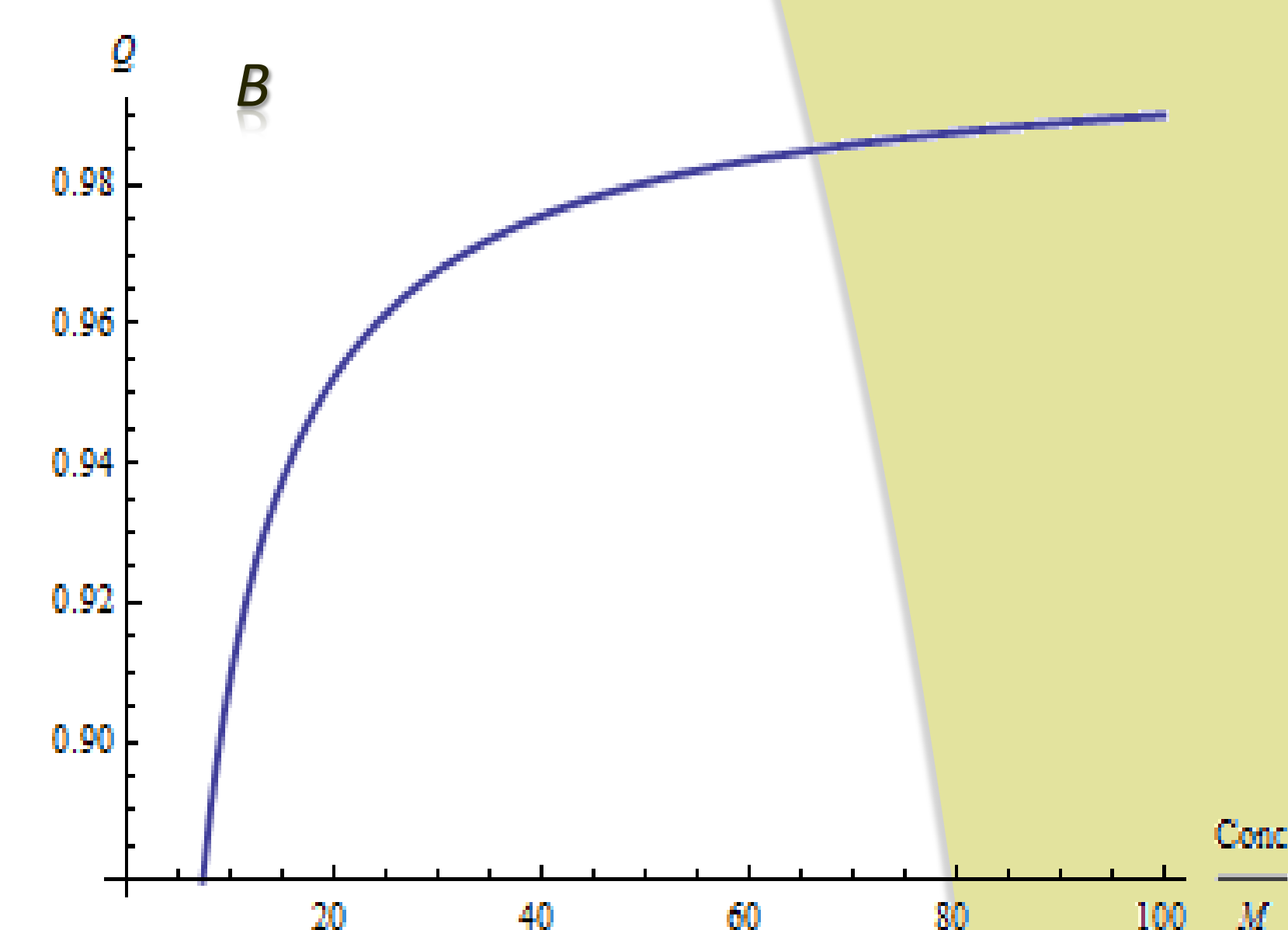


Figura 5- (A) Estrutura química do resíduo de aminoácido triptofano., (B) representação gráfica da curva de Stern-Volmer.

A curva experimental de Regressão Não-linear de Mínimos Quadrados (RNLQM) permitiu o cálculo de K_d, sendo que esta constante permite a descrição da afinidade entre a ADK e os compostos testados. Quanto menor o valor de K_d, maior a afinidade ADK/composto. Abaixo seguem as curvas obtidas nos experimentos de fluorescência de um dos compostos derivados de 8-hidróxi-4-anilinoquinazolinina e a enzima (A), e uma das curvas experimentais da série de compostos, que pertence ao composto derivado 8OH-3Br (B).

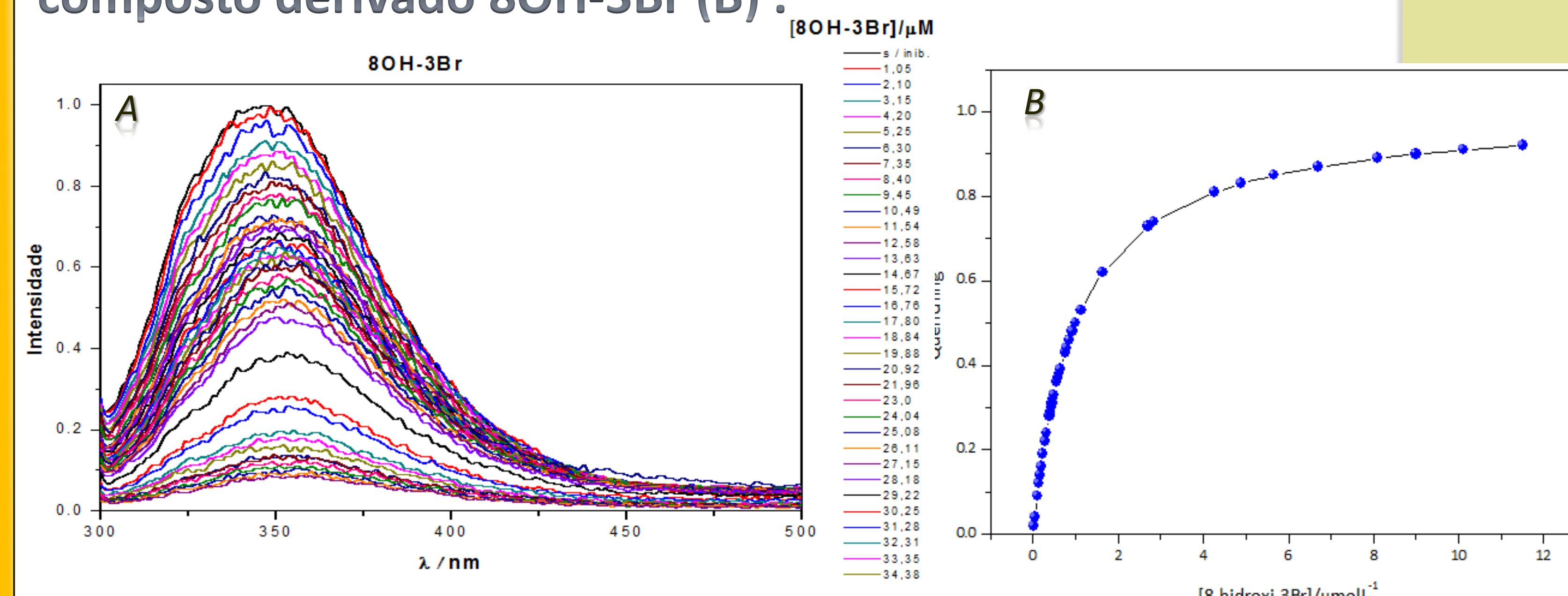


Figura 6 – (A) Espectro de quenching de fluorescência e (B) Gráfico de Stern-Volmer para o composto 8OH-3Br.

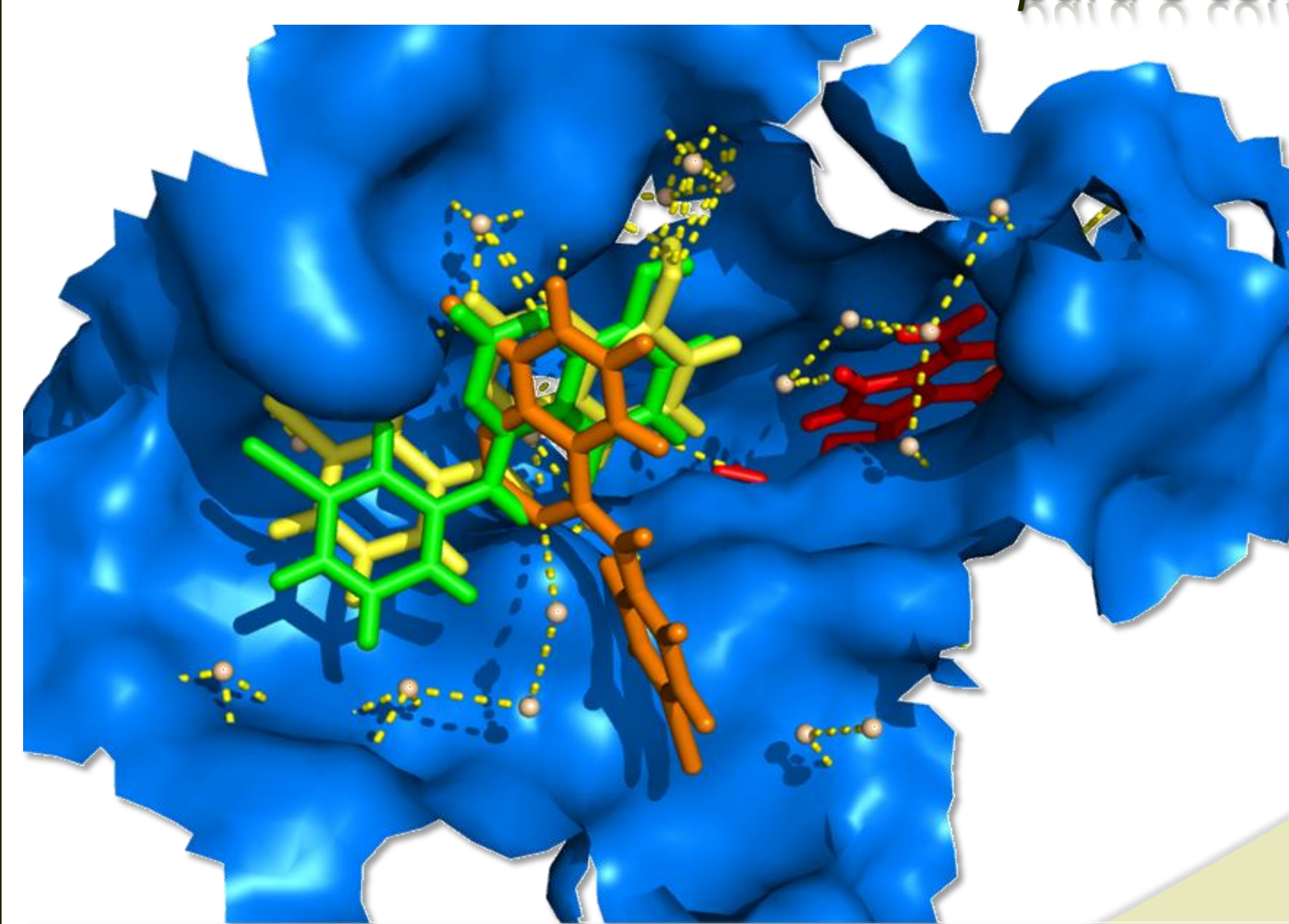


Figura 7 – Localização dos compostos no sítio enzimático da AK, obtidos após ensaios de docking.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos verificam que a classe de compostos estudada pode ser bastante promissora na inibição da ADK e, portanto, podem se tornar potenciais fármacos.

AGRADECIMENTOS

• Dr^a Silvana A. Rocco, LNBio.
• Dr Kleber G. Franchini, LNBio e FCM-UNICAMP.