

Determinação do Modo de Ligação e Mecanismo de Ação de Inativadores da Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*

Tatiane L. Balliano (PG),* Rafael V. C. Guido (PQ), Adriano D. Andricopulo (PQ), Glaucius Oliva (PQ)

*tballiano@ursa.ifsc.usp.br

Laboratório de Química Medicinal e Computacional – Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.

Palavras Chave: Doença de chagas, Inativadores enzimáticos, Mecanismo de ação, GAPDH.

Introdução

A doença de Chagas, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, é um dos problemas médico-sanitários mais importantes na América Latina. Essa enfermidade atinge cerca de 18 milhões de indivíduos causando 50 mil mortes ao ano. Os fármacos disponíveis para o tratamento são limitados e tem seu uso restrito. No Brasil, apenas o benznidazol é usado e apresenta baixa eficácia e sérios efeitos colaterais. Dessa forma, o desenvolvimento de novos fármacos, capazes de oferecer novas alternativas terapêuticas torna-se urgente para o tratamento da doença. Um alvo macromolecular investigado em nosso grupo de pesquisa é a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *T. cruzi*, essencial no controle do fluxo glicolítico em tripanossomatídeos. Triagens biológicas realizadas com sucesso em nossos laboratórios resultaram na identificação de vários inibidores de diversidade química elevada. Um aspecto de extrema importância no contexto do planejamento de inibidores é a investigação do modo de ligação e mecanismo de ação. No presente trabalho, descrevemos as principais diferenças no modo de interação de dois inativadores da GAPDH de *T. cruzi*, ácido iodoacético (**1**) e iodoacetamida (**2**). Estudos cinéticos e cristalográficos auxiliaram nos estudos de identificação do mecanismo de ação e do modo de ligação destes inibidores.

Resultados e Discussão

Ensaio de co-cristalização foram realizados usando uma solução de GAPDH a 11 mg/mL pré-incubada com os inativadores (**1**) e (**2**) nas concentrações de 5 e 1 mM, respectivamente. Os cristais cresceram em duas semanas a 18 °C e os dados foram coletados no LNLS. O mecanismo de inibição proposto para essas moléculas estaria relacionado à formação de um complexo irreversível entre a molécula do inibidor e a cisteína catalítica presente no sítio ativo da GAPDH, conforme revelado por estudos de cinética enzimática. Desse modo, este complexo binário impediria a interação com o cofator NAD⁺.¹ Dados cristalográficos recentes demonstram que o NAD⁺ é importante para a estabilização da interação do inibidor (**1**) no sítio ativo da enzima (interações- π entre o grupo carboxila do ligante e o anel benzamida do NAD⁺) (Figura 1A).² Por outro lado, a análise do complexo GAPDH-(**2**) revelou que a fixação covalente à Cys166 é estabilizada por interações- π entre a cadeia lateral da Tyr339 e o grupo amida do inibidor.

Além disso, duas ligações de hidrogênio com moléculas de água (W131 e W135) estabilizam o modo de ligação de (**2**) no sítio ativo. Desse modo, a molécula do inibidor ocasiona um aumento estérico no sítio ativo da enzima que impediria a ligação do NAD⁺ (Figura 1B).

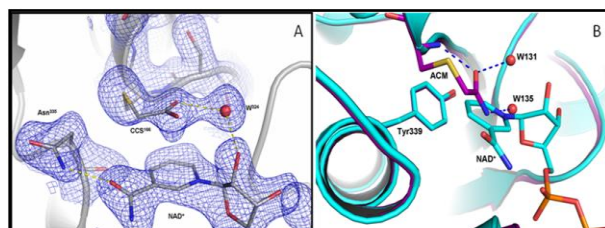


Figura 1. (A) Modo de interação do inativador (**1**) com a GAPDH de *T. cruzi*. (B) Superposição da GAPDH nativa e do complexo GAPDH-(**2**)

A análise comparativa dos mapas de superfície eletrostática para os complexos GAPDH-(**1**) e GAPDH-(**2**) revelou que a densidade residual negativa no primeiro complexo é menor que no segundo (Figura 2A e 2B, respectivamente), sugerindo que a carga residual presente em (**1**) é importante para a permanência do NAD⁺ no sítio ativo.

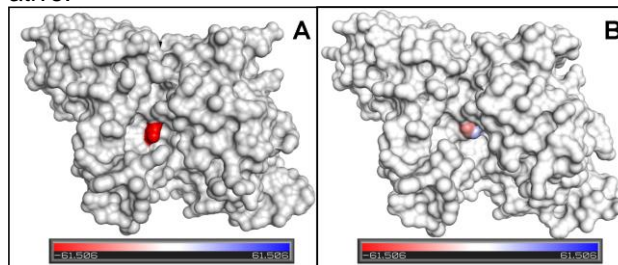


Figura 2. Superfície eletrostática dos inibidores (**1**) (A) e (**2**) (B) nos complexos cristalográficos.

Conclusões

No presente estudo foram determinados o mecanismo de ação e o modo de ligação dos inativadores (**1**) e (**2**) da GAPDH de *T. cruzi*. Estudos cristalográficos revelaram o importante papel do NAD⁺ na estabilização do inibidor (**1**), e os requerimentos estruturais para a fixação de (**2**). Essas informações são relevantes no planejamento de novos inibidores mais potentes e seletivos.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq

¹ Nagradova N.K., Schmalhausen E.V., Levashov P.A., Asryants R.A., Muronetz V.I. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *61*, 47-56.

² Guido R.V.C., Balliano T.L., Andricopulo A.D., Oliva G. *Letts. Drug Discov. Des.*, 2009, *6*, 1-3.