

Estudos Estruturais e do Mecanismo de Ação de Inativadores da Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*

Tatiane L. Balliano (PG),* Rafael V. C. Guido (PG) Adriano D. Andricopulo (PQ), Glaucius Oliva (PQ)
(*tlballiano@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, Inibidores, Mecanismo de ação, GAPDH, Fármaco.

Introdução

A doença de Chagas, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, é um dos problemas médico-sanitários mais importantes na América Latina. A doença atinge cerca de 20 milhões de indivíduos causando 50 mil mortes ao ano.¹ Os fármacos disponíveis para o tratamento quimioterápico (benznidazol e o nifurtimox) são limitados e tem seu uso restrito devido à elevada toxicidade, baixa eficácia e sérios efeitos colaterais. Dessa forma, o desenvolvimento de novos fármacos, seguros e eficazes, é de fundamental importância no controle da doença. Um alvo macromolecular muito investigado em nosso grupo de pesquisa é a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *T. cruzi*, essencial no controle do fluxo glicolítico em tripanosomatídeos. 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 estudos de cinética enzimática empregados na caracterização do mecanismo de ação de dois inativadores da GAPDH de *T. cruzi*, ácido iodoacético (**1**) e iodoacetamida (**2**). Estudos cristalográficos também foram conduzidos e complementam de forma eficaz e segura os estudos cinéticos na elucidação do modo de ligação destes inibidores.

Resultados e Discussão

Estudos de cinética enzimática foram conduzidos utilizando a GAPDH pré-incubada em soluções com concentrações crescentes dos compostos **1** e **2**. A atividade enzimática foi monitorada em diferentes intervalos de tempo, revelando um mecanismo de inibição irreversível, do tipo tempo dependente. Os resultados da cinética destes compostos são apresentados nas Figuras 1. O mecanismo de inibição previamente proposto para essas moléculas estaria relacionado ao impedimento da formação do complexo GAPDH/NAD⁺.^{2,3} Entretanto, estudos cristalográficos realizados neste trabalho com a

GAPDH e o inativador **1** revelaram que o NAD⁺ é importante para a estabilização da interação do inibidor no sítio ativo da enzima (interações-p entre o grupo carboxila do ligante e o anel benzamida do NAD⁺). Portanto, os resultados sugerem que o mecanismo de inibição de **1** estaria envolvido com o impedimento da transferência de cargas, que ocorre entre a cisteína e o NAD⁺, durante a etapa de desidrogenação do substrato GAP. O modo de ligação de **1** no sítio ativo da GAPDH está ilustrado na Figura 2.

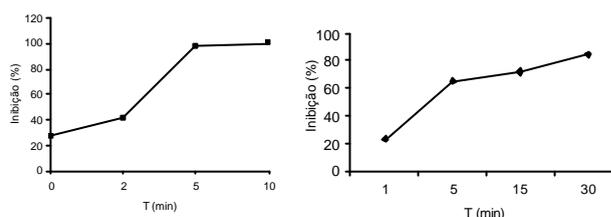


Figura 1. Inibição tempo dependente da enzima GAPDH pelo IAA (A) e IOA (B)

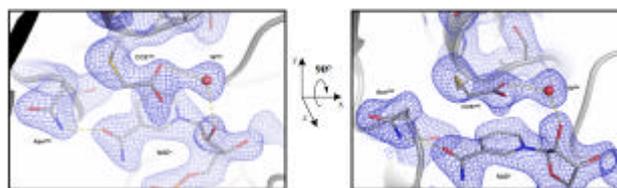


Figura 2. Modo de interação do inativador **1** com a GAPDH de *T. cruzi*.

Conclusões

No presente estudo, foi determinado o mecanismo tempo dependente dos inativadores **1** e **2**. Além disso, estudos cristalográficos forneceram dados experimentais valiosos, que demonstram, pela primeira vez, o modo de ligação de **1** com a GAPDH, evidenciando o papel importante do NAD⁺ para a estabilização do inibidor. Baseado no modo de ligação, um novo mecanismo de inibição foi proposto.

Agradecimentos

CEPID, FAPESP, CNPq

¹ Moncayo A.; Ortiz-Yanine M.I. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **2006**, *100*, 663-677.

² Nagradova N.K., Schmalhausen E.V., Levashov P.A., Asryants R.A., Muronetz V.I. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *61*, 47-56.

³ Even S., Garrigues C., Loubiere P., Lindley N.D., Cocaign-Bousquet M. *Metab. Eng.* **1999**, *1*, 198-205.