

## Estudos do Mecanismo de Ação Inibitório de Doadores de NO Frente à Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*

Tatiane L. Balliano (PG),<sup>1\*</sup> Rafael V. C. Guido (PQ)<sup>1</sup>, Francisco O. N. Silva (PQ)<sup>2</sup>, Luiz G. F. Lopes (PQ)<sup>2</sup>, Jean J. N. Silva (PQ)<sup>1</sup>, Adriano D. Andricopulo (PQ)<sup>1</sup>, Glaucius Oliva (PQ)<sup>1</sup>  
\*tlballiano@ursa.ifsc.usp.br

<sup>1</sup>Laboratório de Química Medicinal e Computacional – Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.

<sup>2</sup>Laboratório de Bioinorgânica - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – Universidade Federal do Ceará.

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

### Introdução

A doença de Chagas, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, é um dos problemas médico-sanitários mais sérios na América Latina. Decorridos 100 anos desde a sua descoberta, a doença atinge cerca de 18 milhões de indivíduos, causando 50 mil mortes ao ano<sup>1</sup>. O único fármaco usados no tratamento quimioterápico apresenta 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 molecular bastante atrativo 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 alguns inibidores de diversidade química elevada. Nesse sentido, especial destaque pode ser dado para o inibidor inorgânico *cis*-[Ru(NO)(bpy)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>]PF<sub>6</sub>, (*c*-[Ru<sup>II</sup>NO<sup>+</sup>]<sup>n+</sup>). No presente trabalho, estudos cinéticos e cristalográficos foram realizados com o objetivo de elucidar o modo de ligação e determinar as bases moleculares envolvidas no mecanismo de ação desta classe de inibidores.

### Resultados e Discussão

Estudos de cinética enzimática foram conduzidos utilizando solução de GAPDH a 0,5 mg/mL na presença do inibidor tornando possível determinar o seu mecanismo tempo dependente. Ensaio de co-cristalização através do método da gota pendurada também foram realizados com a solução de GAPDH a 10 mg/mL pré-incubada com o *c*-[Ru<sup>II</sup>NO<sup>+</sup>]<sup>n+</sup> na concentração de 600 μM. Os cristais cresceram depois de um mês a 18 °C e um conjunto de dados a 1.65 Å de resolução foi coletado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os programas MOSFLM e SCALA foram empregados na integração e escalonamento dos dados, respectivamente, e o refinamento foi realizado utilizando os programas PHENIX e COOT. Depois de vários ciclos de refinamento, a análise dos mapas  $F_o - F_c$  e  $2F_o - F_c$  revelou uma densidade referente ao grupo nitrosil covalentemente ligado ao resíduo catalítico Cys166 nas subunidades A, C e D (Figura 1).

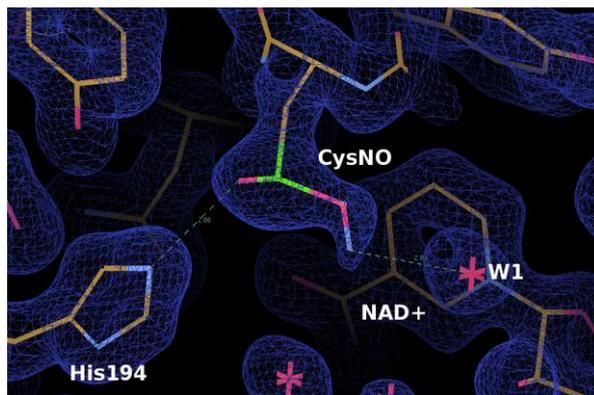


Figura 1. Modo de interação do inibidor *c*-[Ru<sup>II</sup>NO<sup>+</sup>]<sup>n</sup> à Cys166 (CysNO) da enzima GAPDH de *T. cruzi*.

O complexo formado é estabilizado por ligações de hidrogênio com o resíduo His194 e com uma molécula de água W1, interações-π são também observadas com o grupo benzimidamida do cofator NAD<sup>+</sup>. O modo de ligação sugere que o mecanismo de reação ocorra de acordo com o esquema.<sup>2</sup>



A enzima interage com o inibidor formando um intermediário instável, resultando na nitrosilação do resíduo Cys166 do sítio catalítico.

### Conclusões

No presente estudo, foram realizados estudos cinéticos que determinaram o mecanismo tempo dependente do inibidor *c*-[Ru<sup>II</sup>NO<sup>+</sup>]<sup>n+</sup>. Além disso, a análise estrutural do complexo GAPDH/*c*-[Ru<sup>II</sup>NO<sup>+</sup>]<sup>n+</sup> permitiu a elucidação do modo de ligação e elaboração de uma hipótese para o mecanismo de inibição. A integração de métodos de cinética enzimática e cristalografia constitui-se em importante ferramenta em química medicinal no planejamento de novos fármacos que atuam em alvos definidos com mecanismo conhecido.

### Agradecimentos

CEPID, FAPESP, CNPq

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

<sup>2</sup> Bocedi, A., Gradoni, L., Menegatti, E., Ascenzi, P.. *Biochem. Biophys. Resear. Comm.* **2004**, *315*, 710-718.