

Uso de Calorimetria e Docagem Molecular para Avaliação de Análogos ao Cofator NAD⁺ como Inibidores da Enzima TcGAPDH

Fabyana A. Soares^{1,3} (PG), *Emanuella M.B. Fonseca^{1,3} (PG), Maria C. B. V. de Souza² (PQ), Carlos A. Montanari³ (PQ) *emanuella.fonseca@gmail.com

¹ Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

² Universidade Federal Fluminense, Centro de Estudos Gerais, Instituto de Química - Niteroi, RJ - Brasil

³ Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais, Instituto de Química de São Carlos – USP

Palavras Chave: Doença de Chagas, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, Calorimetria de Titulação Isotérmica

Introdução

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada que afeta aproximadamente 18 milhões de indivíduos, causando cerca de 10 mil mortes/ano¹.

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Trypanosoma cruzi* aparece como um alvo promissor para pesquisa de novos fármacos para a doença². A TcGAPDH é uma das enzimas envolvidas na via glicolítica do *T. cruzi*. Neste trabalho foi realizado o estudo cinético e docagem molecular de compostos contra a TcGAPDH. A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) mede a troca de calor observada durante uma reação e vem sendo utilizada atualmente para determinar parâmetros termodinâmicos e cinéticos. A docagem molecular foi utilizada como ferramenta para compreensão do mecanismo de reconhecimento molecular enzima-inibidor. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma série de compostos nucleosídeos, análogos ao NAD⁺, como inibidores da enzima TcGAPDH.

Resultados e Discussão

Uma vez que os compostos testados eram similares ao NAD⁺ a reação cinética foi realizada em relação à pseudo-ordem para este substrato. Foi determinado a constante de inibição (K_i^{app}) e o mecanismo de inibição das moléculas que foram ativas contra a enzima TcGAPDH. Quatro compostos foram testados contra a enzima TcGAPDH, todas foram ativas e apresentaram mecanismos de inibição competitivo. As K_i^{app} são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de K_i^{app} e mecanismo de inibição

Composto	K_i^{app} (μ M)	Mecanismo
NEQUIMED137	5,8 \pm 0,22	Competitivo
NEQUIMED135	6,3 \pm 0,56	Competitivo
NEQUIMED 141	6,8 \pm 0,46	Competitivo
NEQUIMED140	21,10 \pm 1,3	Competitivo
	K_M (μ M)	
NAD ⁺	80 \pm 7,0	

Na tentativa de prever o modo de ligação do inibidor na região de ligação do NAD⁺ na TcGAPDH, foi feito estudo computacional de docagem molecular usando o programa GLIDE. A

pontuação obtida para os 4 inibidores está apresentada na Tabela 2, bem como a eficiência do ligante predita.

Tabela 2. Energia livre de interação, eficiência do ligante predita e experimental

Composto	Pontuação (Kcal.mol ⁻¹)	LE Predito	LE Exp.
NEQUIMED137	-7,99	0,33	0,30
NEQUIMED135	-7,71	0,32	0,29
NEQUIMED 141	-7,66	0,32	0,29
NEQUIMED140	-7,60	0,32	0,26

Na docagem (Figura 1a-c) as moléculas apresentaram boa complementaridade com o sítio de interação da TcGAPDH; no entanto, em orientação diferente em relação ao NAD⁺.

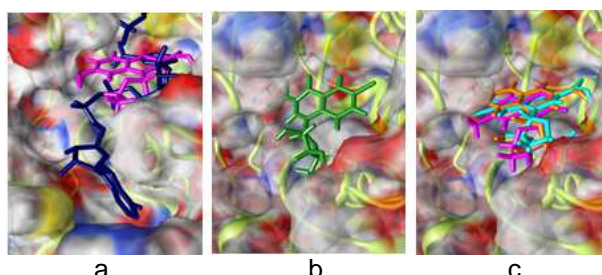


Figura 1a. NAD⁺ e NEQUIMED137 dentro do sítio da TcGAPDH, **1b.** composto 140 e **1c.** compostos 137, 135 e 141.

Conclusões

ITC foi utilizado com sucesso para identificar inibidores TcGAPDH novos e potentes que atuam diretamente como inibidores competitivos para o cofator NAD⁺. Estes são os primeiros análogos do NAD⁺ com baixo peso molecular encontrados como inibidores competitivos.

Através do estudo de docagem das moléculas foi possível uma melhor compreensão da forma que inibidor e a enzima interagem. Este estudo será importante para otimização destes inibidores.

Agradecimentos

IQSC, FAPESP, CNPQ, CAPES, NEQUIMED, SCHRÖDINGER

¹ Moncayo, A, et. al. *Mem. Int. Oswaldo Cruz.* **2009**, *104*, 17.

² Freitas, R. F. ;et al *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2476-2482.