

Planejamento de compostos ativos contra a TcGAPDH de *Trypanosoma cruzi* e ensaio bioquímico por ITC

*Igor M. Prokopczyk (PG);¹ Renato F. Freitas (PQ);² Carlos A. Montanari (PQ).¹ improko@iqsc.usp.br

¹ Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo - Av. Trab. Sancarlense, 400 CP 780 São Carlos - SP CEP 13560-970 - Fone: (16) 3373 8060

² Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Departamento de Ciências Biológicas. Praça Manoel Terra, 330 38015-050 Uberaba - MG fone: (34) 33185487

Palavras Chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Quiminformática; GAPDH; ITC

Introdução

A doença de Chagas é uma das mais negligenciadas doenças tropicais. Esta se espalhou por vários países, que vão desde o sul da América Latina chegando até ao sul dos Estados Unidos.¹ Atualmente existem apenas dois fármacos que mostram-se ineficazes na fase crônica e apresentam graves efeitos colaterais. No entanto, tal perspectiva tem-se alterado durante a última década devido a importantes avanços na pesquisa de compostos tripanossomatídeos. Um exemplo disso é o ravuconazol que entrará em fase clínica 2 em 2011 na Bolívia. Dentre os vários alvos bioquímicos em estudo, a enzima da via glicolítica de tripanossomatídeos – a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12) vem sendo estudada em nosso Grupo de Pesquisa.² Este trabalho apresenta a busca de novos inibidores de *T. cruzi* GAPDH utilizando a planejamento baseado na estrutura do alvo (SBVS) juntamente com calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para o ensaio bioquímico dos compostos selecionados.

Resultados e Discussão

Inicialmente foi feito um planejamento baseado na estrutura do alvo (TcGAPDH, PDB 1QXS) usando informações sobre interações específicas com os resíduos de aminoácidos SER247 e THR167 que mostram-se importantes para a interação dos compostos ativos (Figura 1).³ Para a docagem molecular foi usado o programa Glide com função *extra precision*.

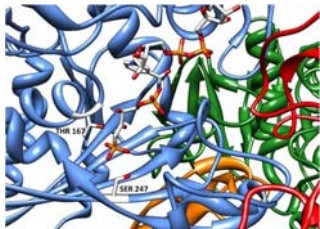


Figura 1. Estrutura 1QXS com as restrições nos resíduos SER247 e THR167

Após a avaliação por docagem, foram adquiridos 32 compostos para serem testados por ITC. Os ensaios de inibição foram realizados, inicialmente, em uma concentração fixa do inibidor (50 μ M) e o substrato G3P foi titulado na cela de amostra para

determinar as curvas cinéticas. Estas análises permitiram medir a constante aparente e identificar o mecanismo de inibição.

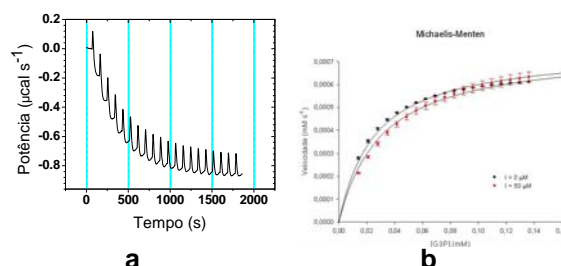


Figura 2. Curva do ITC (a) e curva de Michaelis-Menten na presença (vermelho) e ausência (preto) de inibidor (b) para o Nequimed114

A Tabela 1 apresenta os valores de K_i^{app} dos compostos ativos.

Tabela 1. Valores de K_i^{app} dos compostos ativos contra a TcGAPDH e suas respectivas massas molares

Composto	K_i^{app} (μ M)	MM (Da)
Nequimed104	62,42 \pm 1,48	482,57
Nequimed111	44,71 \pm 3,01	431,44
Nequimed114	262,16 \pm 4,59	439,48
Nequimed126	350,81 \pm 8,14	441,52

$K_M^{G3P} = 22,50 \pm 1,57 \mu$ M

Dos 15 compostos testados 4 mostraram-se ativos contra a enzima TcGAPDH. Os valores de K_i^{app} para dois compostos estão abaixo de 100 μ M. Três dos quatro compostos ativos apresentaram mecanismo de inibição enzimática do tipo competitivo.

Conclusões

A estratégia utilizada mostrou-se eficaz e permitiu a identificação de compostos capazes de inibir a TcGAPDH em moderadas concentrações micromolar. Os compostos Nequimed111 e 114 servem de modelo para reavaliação do processo.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP, CAPES, SCHRÖDINGER e NEQUIMED-PN

¹ Coura, J. R.; Vinas, P. A., *Nature*, **2010**, 465 (n7301_suppl), S6-S7.

² Freitas, R. F.; Prokopczyk, I. M., *et al*; *Bioorganic & Med. Chem.* **2009**, 17 (6), 2476-2482.

³ Freitas, R. F.; *et al*; **Resultados não publicados**