

Padronização e Validação de Um Novo Ensaio Cinético para a Triagem de Inibidores da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *T. cruzi*.

Denis Massucatto (IC),* Aderson Zottis (PG), Rafael V. C. Guido (PG)
Glaucius Oliva (PQ), Adriano D. Andricopulo (PQ) (mpmassuca@gmail.com)

Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - CBME, IFSC – USP

Palavras Chave: gGAPDH, tio-NAD, padronização de ensaio enzimático

Introdução

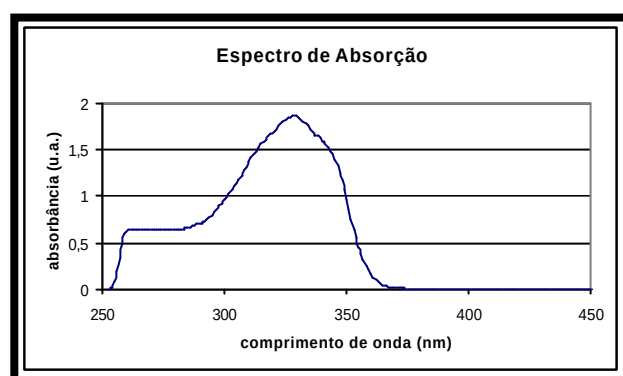
A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH) de *T. cruzi* cataliza a conversão de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-bifosfoglicerato. Nesta reação, ocorre a redução do cofator NAD^+ , produzindo NADH (Fig. 1). O ensaio cinético convencional, utilizado na triagem de substâncias químicas que visa à identificação de inibidores da enzima-alvo candidatos a novos agentes anti-chagásicos, é realizado monitorando-se a formação de NADH, através do aumento da absorbância no comprimento de onda de 340 nm. O emprego desse bioensaio, embora eficaz no monitoramento da atividade enzimática, leva a uma redução considerável do número de substâncias viáveis para análise (cerca de 50%), as quais absorvem no mesmo comprimento de onda monitorado. Com o objetivo de viabilizar a avaliação biológica de substâncias em um comprimento de onda alternativo, o presente trabalho descreve a padronização e validação de um novo ensaio cinético.

Figura 1. Esquema da reação enzimática catalisada pela GAPDH de *T. cruzi*.

Resultados e Discussão

O planejamento deste novo método de ensaio enzimático consistiu em monitorar uma região do espectro eletromagnético na qual as interferências das substâncias candidatas fossem minimizadas. Vários experimentos foram realizados até chegarmos a novas condições para a padronização do bioensaio, que tem como maior inovação o emprego da tioricotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (tio-NAD⁺), substância análoga ao substrato convencionalmente utilizado. Desta forma, o novo produto de reação a ser monitorado é o tio-NADH, (forma reduzida do tio-NAD⁺), que possui absorbância

região convenientemente afastada daquela usualmente observada para as substâncias submetidas às triagens *in vitro* (Fig. 2) Neste processo de padronização e validação, foi realizada



também a determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) para o tio-NAD⁺ e G3P.

Figura 2. Espectro de uma substância com um perfil inadequado para avaliação biológica pelo método de análise convencional ($\lambda = 340$ nm).

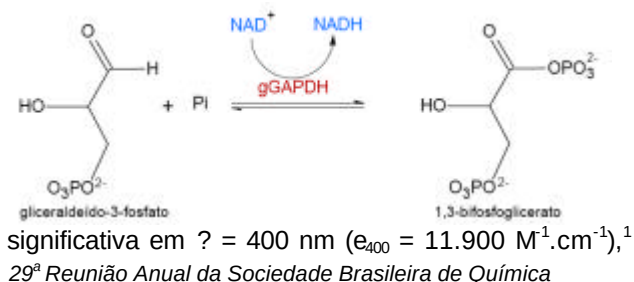
Para a validação do novo método, ensaios cinéticos utilizando inibidores já identificados pelo método convencional foram realizados, sendo que os resultados de ambos revelaram boa concordância e confiabilidade nas medidas cinéticas (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de inibição de duas substâncias em ambos os métodos.

Substância	NAD ⁺ (340 nm)	tio-NAD ⁺ (400 nm)
A	90 ± 5	86 ± 2
B	67 ± 2	65 ± 2

Conclusões

O novo método padronizado e validado será útil na avaliação de um número bem maior de substâncias contra a enzima GAPDH de *T. cruzi*, maximizando-se as chances de identificação de inibidores candidatos a protótipos de novos agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas.



Agradecimentos

FAPESP, CNPq.

¹ Stein A.M.; Lee J.K.; Anderson C.D. e Anderson B.M.,
Biochemistry 2_**1963**.1015–1017.