

Estudo da Atividade de GAPDH de *T. cruzi* frente à Adição de Cossolventes Utilizando a Titulação Calorimétrica Isotérmica.

Helton J. Wiggers¹ (PG), Juliana Cheleski¹ (PG), Adriano D. Andricopulo² (PQ) e Carlos A. Montanari^{1*} (PQ).

¹ Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais, Instituto de Química de São Carlos -USP.

² Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Instituto de Física de São Carlos - USP

montana@iqsc.usp.br

Palavras Chave: Titulação Calorimétrica Isotérmica, GAPDH, cossolvente e Doença de Chagas.

Introdução

A doença de Chagas é causada por um protozoário flagelado chamado *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que cerca de 18 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina.

Benzonidazol e Nifurtimox são os fármacos disponíveis para o tratamento da doença, porém apresentam baixa eficácia e fortes efeitos colaterais.

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), presente na via glicolítica do parasito, é um alvo promissor para a busca de novos fármacos.

Neste trabalho estudou-se a atividade da enzima GAPDH frente à adição de DMSO e Metanol como cossolventes através da Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC)², com o objetivo de estabelecer um método de bioensaio robusto para a busca de novos inibidores.

Resultados e Discussão

A donagem, expressão e purificação da enzima GAPDH foram realizadas usando métodos previamente estabelecidos. A concentração da enzima nos ensaios foi de 5nM, determinada pelo método de Bradford. O tampão usado para os ensaios enzimáticos foi TEA-HCl 100 mM, pH 7.5 com 1 mM β -mercaptoetanol, 30 mM de arseniato de sódio e 1,5 mM NAD⁺. O substrato da reação, gliceraldeído-3-fosfato (G3P), 2,5 mM, foi preparado no mesmo tampão, para minimizar os calores de diluição.

No ensaio biocalorimétrico a enzima foi colocada na cela de amostra e o substrato na seringa, utilizando-se o método das injeções múltiplas. Desta forma não foi observada inibição significativa da reação pelo produto.

Os parâmetros utilizados nos ensaios foram: 20 injeções de 5 μ L, intervalo entre injeções 60 s, velocidade de agitação 307 rpm, temperatura 25 °C. Um experimento controle foi feito sem adição de cossolvente. Posteriormente fizeram-se os ensaios com a adição de 2,5, 5, 7,5 e 10% de DMSO e repetiram-se os experimentos usando metanol.

Determinou-se a entalpia aparente da reação para a obtenção da velocidade de reação.

A curva representativa do ensaio cinético é apresentada na Figura 1.

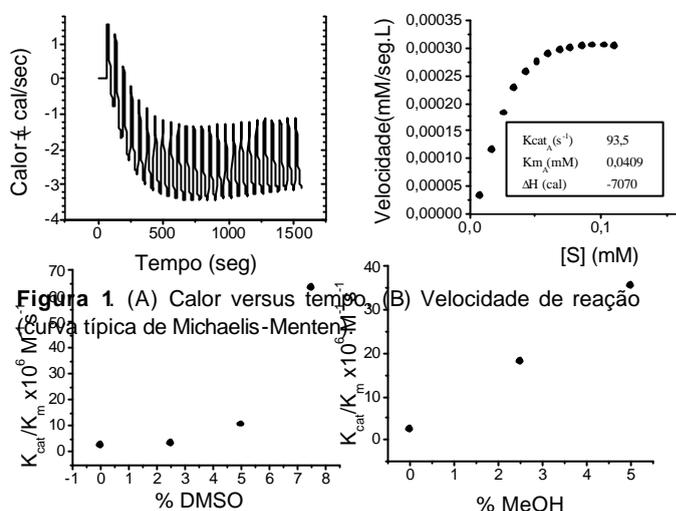


Figura 1. (A) Calor versus tempo. (B) Velocidade de reação típica de Michaelis-Menten.

Figura 2. Atividade versus concentração do cossolvente. As curvas da Figura 2 mostram um aumento da atividade da enzima, sugerindo um aumento da afinidade desta pelo substrato na presença dos cossolventes. Na presença de 7,5% e 10% de Metanol e DMSO, o calor de diluição do substrato foi maior que o limite de detecção do calorímetro.

Conclusões

O método calorimétrico mostrou-se eficiente nos bioensaios. Em apenas um experimento é possível determinar a constante catalítica da reação (k_{cat}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m).

A atividade da enzima é aumentada na presença de cossolvente, sendo possível testar inibidores com baixa solubilidade em água em concentrações de até 5% de DMSO ou MeOH.

Agradecimentos



¹ DARDONVILLE, C. *Expert Opin. Ther. Patents*, **2005**, 15, 1

² TODD, M., GOMEZ, J. *Anal. Biochem.* **2001**, 296, 179