

## Ensaio enzimático da enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi* por Calorimetria Isotérmica de Titulação. II

Helton José Wiggers<sup>1</sup>, Juliana Cheleski<sup>1</sup>, Carmen L. Cardoso<sup>3</sup>, Adriano Defini Andricopulo<sup>2</sup>, Carlos Alberto Montanari<sup>1\*</sup>

e-mail: montana@iqsc.usp.br

<sup>1</sup> Instituto de Química de São Carlos <sup>2</sup>Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo - Av. Trab. Sancarlense, 400 - São Carlos – SP CEP 13560-970 <sup>3</sup>Departamento de Química – FFCL-RP, USP.

Palavras Chave: Doença de Chagas, GAPDH, ITC, Cinética enzimática.

### Introdução

A calorimetria isotérmica de titulação (ITC) vem sendo estudada para determinar parâmetros cinéticos de várias enzimas de todas as classificações da *Enzyme Commission*. Durante a 30ª RA da SBQ, mostramos o efeito do emprego de cossolventes na determinação da atividade enzimática da enzima GAPDH (EC 1.2.1.12) de *T. cruzi*. Neste trabalho, a atividade inibitória do ácido 4-butilfenil-aminometileno-fosfônico, identificado por ensaio virtual *in silico*, foi determinada por ITC. A sua docagem contra o sítio ativo da GAPDH mostrou um posicionamento próximo à tirosina-199, a mesma identificada por cristalografia de raios X para outros ácidos fosfônicos.

### Resultados e Discussão

A docagem de pequenas moléculas contra o sítio ativo e o sítio do NAD<sup>+</sup> da enzima GAPDH foi realizada usando o programa AutoDock4. O ácido fosfônico identificado no ensaio virtual entre as cem melhores substâncias pontuadas na função de escores foi testado contra a GAPDH de *T. cruzi* e sua atividade inibitória foi confirmada por ITC. Inicialmente, a entalpia aparente da reação de conversão de G3P a 1,3-DPG foi determinada  $\Delta_{app}H = -30,7(\pm 1,5 \text{ KJ mol}^{-1})$ . Em estudo anterior, identificamos a inibição enzimática pelo produto 1,3-DPG<sup>1</sup>. Dessa forma, todos os experimentos foram realizados suprimindo-se a fase de inibição da GAPDH. A Figura 1 mostra os dados originais (A) e o ajuste para a equação de Michaelis-Menten (B) em um experimento planejado para operar via condições de pseudo-primeira-ordem. Pode-se observar, claramente, o estabelecimento do estado estacionário em todas as etapas do processo de injeção múltipla e, ao final, o patamar representativo da atividade enzimática máxima. Os parâmetros cinéticos assim obtidos, para as condições do experimento, são:  $k_{cat} = 73,7 \text{ s}^{-1}$  e  $K_M = 35,4 \text{ }\mu\text{M}$ , coerentes com os valores previamente obtidos<sup>1</sup>. O experimento foi então realizado na presença do inibidor usando o método competitivo por

deslocamento no qual a enzima é previamente parcial ou totalmente saturada com diferentes concentrações do inibidor. A constante de afinidade aparente ( $K_i^{app}$ ) foi determinada como sendo igual a  $20,1(\pm 1,70 \text{ }\mu\text{M})$ , Figura 2.

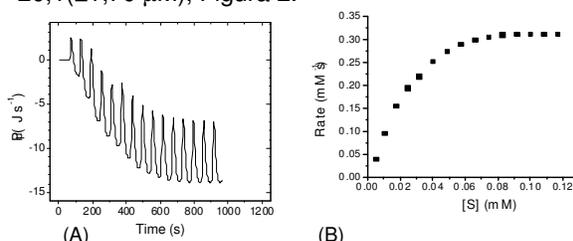


Figura 1. Ensaio da GAPDH por ITC. (A) dados originais. (B) Dados ajustados à equação de Michaelis-Menten

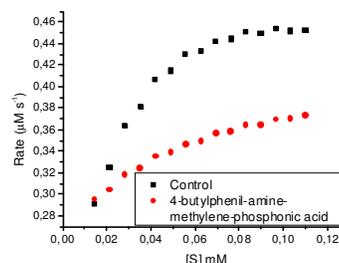


Figura 2. Avaliação da atividade inibitória do ácido fosfônico frente à GAPDH pelo método ITC competitivo por deslocamento

### Conclusões

A inibição da GAPDH ocorre por mecanismo não-competitivo mostrado na Figura 2.

A realização conjunta dos ensaios *in silico* e bioquímico demonstram uma excelente estratégia na busca por novos inibidores da GAPDH de *T. cruzi*. Além disso, a determinação do mecanismo de inibição enzimática é de fundamental importância em estudos ulteriores de relações estrutura-atividade (SAR) – em prática corrente em nossos laboratórios.

### Agradecimentos

CNPq, FAPESP, AutoDock4.0 - The Scripps Research Institute.

<sup>1</sup> Wiggers et al. *Anal. Biochem.* **2007**, 370, 107 e 31 RA da SBQ