

Ensaio de triagem de ligantes da enzima Purina nucleosídeo fosforilase humana por cromatografia líquida *in line*

Isabela A. T. Ximenes¹(PG), Marcela C. de Moraes^{1*}

*mcmoraes@id.uff.br

¹ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UFF

Palavras Chave: Enzimas, imobilização, cinética, cromatografia de bioafinidade.

Introdução

A enzima Purina nucleosídeo fosforilase (PNP, do inglês Purine Nucleoside Phosphorylase) desempenha um papel fundamental na via de salvamento de purinas. A relação entre sua deficiência em humanos e desordens mediadas por células T sugerem que esta enzima é um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes imunossuppressores seletivos. Além disso, inibidores de PNP podem ser usados para evitar a clivagem de fármacos anticâncer e antivirais. Uma abordagem promissora para identificar novos inibidores da PNP consiste em sua imobilização em partículas magnéticas. Tal abordagem possibilita a reutilização da enzima em diversos ensaios e elevada produtividade. Após o processo de imobilização, as partículas recobertas com a enzima são aprisionadas em tubos de PEEK, através do uso de ímãs de Neodímio, e utilizadas em ensaios cromatográficos *in line* a uma coluna analítica que permite a separação do substrato e produto da reação catalisada pela enzima. Assim, a atividade da enzima é monitorada através da quantificação direta do produto formado.

Resultados e Discussão

A enzima PNP humana foi imobilizada covalentemente em partículas magnéticas com terminação amino comercializadas pela Sigma® (10µm) através da formação de bases de Schiff. Para o monitoramento da atividade da enzima imobilizada, as condições de separação cromatográfica entre inosina (substrato) e hipoxantina (produto) utilizadas foram: coluna C18 (Agilent, 15 x 0,46 cm, 5 µm) e fase móvel de separação contendo uma solução aquosa de trietilamina (1 % v/v acidificada com ácido acético, pH 6,0):MeOH (95:5), na vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e detecção em 249 nm. O método *in line* (figura 1) foi validado obtendo-se linearidade ($y = 14876x - 11453$ e $R^2 = 1$), exatidão (83,2 -105,3 %), precisão intermediária (0,24 a 5,63 %) e limite de quantificação (5,0 µM). Nos estudos cinéticos determinou-se o valor de K_M para a enzima imobilizada igual a $1084 \pm 111 \mu\text{mol.L}^{-1}$, mostrando que a enzima reteve sua eficiência catalítica após a imobilização e no sistema em fluxo utilizado.

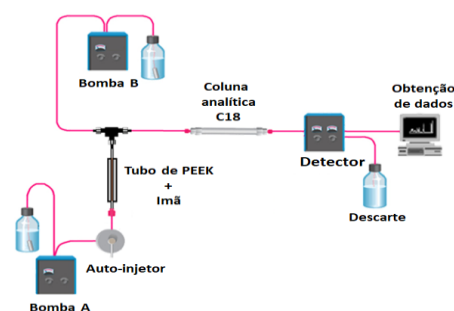


Figura 1. Diagrama do método *in line*.

A validação do emprego do método nos ensaios de triagem de ligantes foi realizada com um inibidor previamente descrito da PNP, o DI4G (derivado de imucilina de 4ª geração) e o valor de IC_{50} obtido foi de $317,5 \pm 26,7 \text{ nmol.L}^{-1}$. O gráfico dose-resposta obtido é apresentado na figura 2.

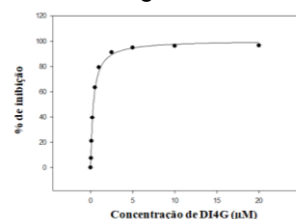


Figura 2. Determinação da potência inibitória (IC_{50}) pelo método *in line*.

Após a validação do método no reconhecimento de ligantes, foram realizados ensaios de triagem de compostos sintéticos e naturais, mas nenhum potente inibidor foi identificado até o momento.

Conclusões

Este estudo relata pela primeira vez o uso de enzimas imobilizadas em partículas magnéticas para a triagem de inibidores enzimáticos através da cromatografia multidimensional *in line*. Os resultados evidenciaram que a PNP imobilizada manteve-se ativa possuindo excelentes características como fácil isolamento do meio biocatalítico, alta eficiência e reciclabilidade tendo potencial para aplicação em larga escala na triagem seletiva de ligantes.

Agradecimentos

CAPES, FAPERJ, CNPq e FIOCRUZ

¹ Bzowska, A.; Kulikowska, E.; Shugar, D. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *88*(3), 349.

² Moraes, M. C.; et. al. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1232*, 110–115.