

ALFA-D-GLICOSIDASE ÁCIDA: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM AMOSTRAS DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO

Dácio Franco Weiler Piloti¹, Janice Carneiro Coelho²

¹ Autor, Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Orientadora



UFRGS
PROFESQ

XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas

INTRODUÇÃO

A Doença de Pompe (DP) é uma doença lisossômica de depósito (DLD), de herança autossômica recessiva, rara e progressiva onde a enzima alfa-D-glicosidase ácida (GAA) encontra-se deficiente. Essa deficiência gera um acúmulo de glicogênio nos lisossomos da célula, principalmente no tecido muscular e assim, o aparecimento dos sintomas clínicos. O diagnóstico para DP é realizado através da medida da atividade da GAA usando o substrato sintético fluorimétrico 4-metilumbeliferil- α -D-glicopiranosídeo em biópsias musculares, fibroblastos cultivados a partir de biópsias de pele, leucócitos totais ou linfócitos purificados de sangue. O diagnóstico precoce da DP, assim como das demais DLDs, é uma etapa essencial para que os tratamentos em desenvolvimento sejam mais eficazes. Para isso, tem-se desenvolvido métodos de triagem onde a medida da atividade das enzimas lisossomais é realizada de forma direta em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SPF). O uso de leucócitos totais também é utilizado para o diagnóstico de deficiência enzimática devido a rapidez do método e da obtenção das amostras de sangue. Fibroblastos são usados como diagnóstico confirmatório para DP.

OBJETIVO

Determinar parâmetros bioquímicos (K_m , V_{max} e pH ótimo) em amostras de SPF de indivíduos saudáveis para posterior comparação com amostras de pacientes com DP em diferentes amostras biológicas.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 10 amostras de controles saudáveis, nas quais realizamos a medida da atividade enzimática conforme Castilhos et al (2011), em placas de 96 poços. Para determinar o pH ótimo, utilizamos tampões para preparação do substrato com pH variando de 4,0 a 6. K_m e V_{max} foram estimados usando uma curva de concentração de substrato, com concentrações que variaram de 2mM a 15mM.

RESULTADOS:

Através deste trabalho, podemos estabelecer o pH ótimo da enzima em 4,4 (figura A). Este pH ótimo foi usado nos ensaios e determinou valores para K_m e V_{max} de, 5,23mM e 7,72nmol/20h/mL. (figura B).

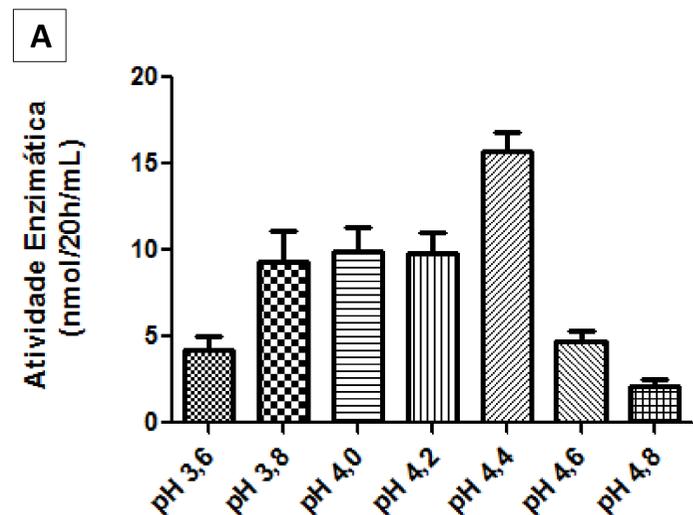


Fig. A) Efeito do pH na atividade da GAA em SPF de indivíduos saudáveis.

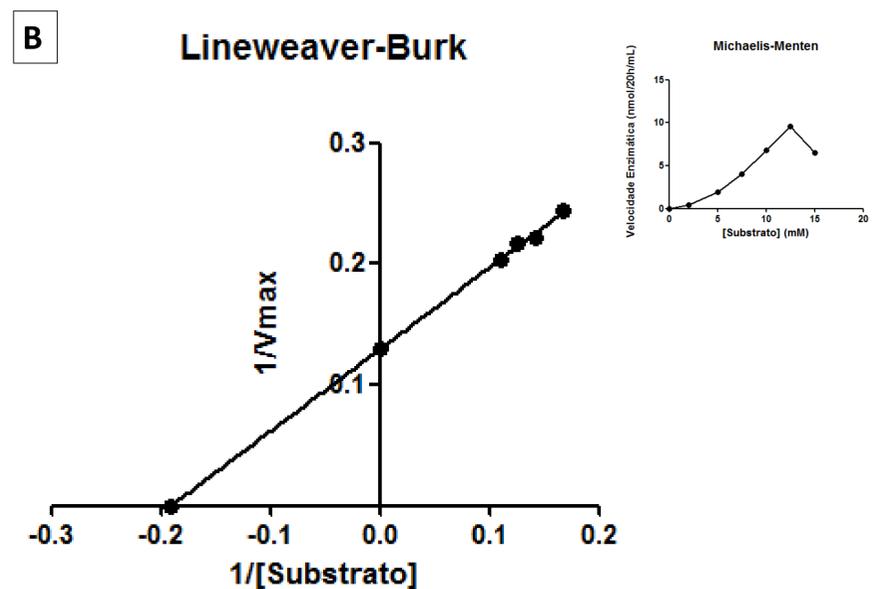


Fig. B) Gráfico de Lineweaver-Burk plot da GAA em SPSF de indivíduos saudáveis. S = substrato, V = velocidade

CONCLUSÃO

Estes resultados são importantes para a caracterização desta enzima em diferentes tipos de amostras e podem ser úteis para o diagnóstico da Doença de Pompe. Esta possibilidade tem sido relatada em outros estudos que encontraram diferenças para esses parâmetros em indivíduos saudáveis e pacientes com DLDs.