

Determinação Biocalorimétrica da Interação de dois novos Inibidores de Cisteíno Proteases.

Juliana Cheleski¹ (PG), Helton J. Wiggers¹ (PG), Flávio H. Silva² (PQ) e Carlos Montanari^{1*} (PQ).

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

² Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR.

montanai@iqsc.usp.br

Palavras Chave: Titulação Calorimétrica Isotérmica, Cisteíno Protease, Cistatinas e Doença de Chagas.

Introdução

A enzima cruzipaina é um alvo validado na busca de fármacos contra o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico causador da doença de Chagas. Esta enzima pertence à família das papaínas, sendo uma cisteíno protease, assim como a cathepsina-L e B, alvos contra o câncer.

A enzima xilelaína, também um membro da família da papaína, está sendo usada como modelo na busca de novos inibidores para a Cruzipaina. Duas novas cistatinas isoladas da cana de açúcar, chamadas Canacistatina-3 e 3C, foram testadas contra a xilelaína.

A determinação dos parâmetros termodinâmicos de interação, através da titulação calorimétrica isotérmica (ITC) e a determinação da temperatura de desnovoelamento (T_m) da enzima xilelaína e dos inibidores, através da Nano-Calorimetria Exploratória Diferencial (n-DSC) auxiliam na busca de moléculas bioativas contra o *T. cruzi*.

Resultados e Discussão

Clonagem, expressão e purificação da enzima xilelaína e dos inibidores por métodos previamente estabelecidos¹. As concentrações das proteínas foram determinadas pelo método de Bradford: 128,69 μ M Canacistatina 3C, 63,76 μ M Canacistatina 3 e 36,75 μ M de enzima xilelaína em solução tampão 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0.

No ensaio biocalorimétrico utilizou-se a enzima na cela de amostra e os inibidores na seringa, empregando o método de injeção simples. Volume de injeção 200 μ L a 25°C.

A determinação da T_m (Figura 1) mostra que a conformação nativa das proteínas é mantida na temperatura de estudo a 25°C.

A “assinatura termodinâmica” de interação entre a enzima xilelaína e os inibidores são mostrados na Figura 2.

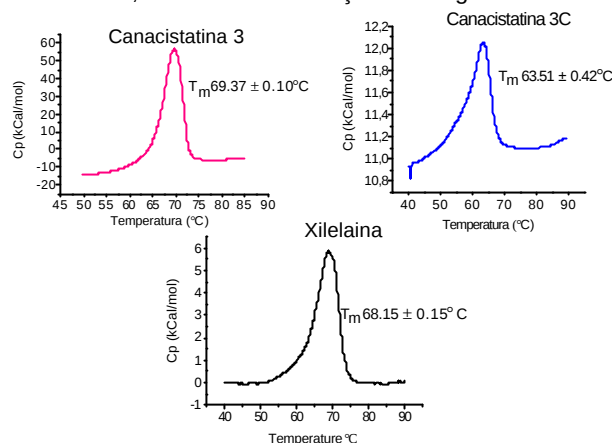


Figura 1. Os picos definem a temperatura de desnovoelamento (T_m), o deslocamento da linha base define a mudança da capacidade calorífica (ΔC_p)

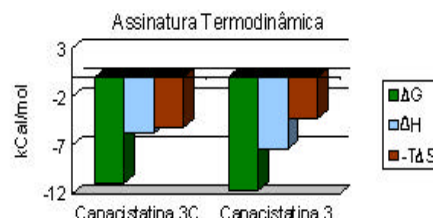


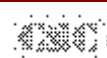
Figura 2. Assinatura Termodinâmica dos dois inibidores.

A entalpia e a entropia mostram-se favoráveis à interação dos inibidores com a enzima xilelaína. A energia livre de Gibbs reflete a espontaneidade do processo.

Conclusões

As canacistatinas apresentam interação favorável com a enzima xilelaína, mostrando serem promissoras moléculas inibidoras de cisteíno proteases.

Agradecimentos



¹GIANOTTI, A.; RIOS, W.; COSTA, A.; NOGAROTO, V.; CARMONA, A.; OLIVA, V.; ANDRADE, S.; SILVA, H.F.; Protein Expression and Purification, 2006, 47, p. 483 – 489.

