

Título em Português:	Determinação da Constante de Afinidade de Inibidores de Cisteíno Proteases
Título em Inglês:	On the Affinity of Cysteine Protease Inhibitors
Área de Pesquisa:	Química Orgânica
Palavras Chave:	Hidrolases - Cisteíno proteases - Peptideomiméticos
Ag. Financiadora do Projeto:	
Projeto:	Iniciação Científica
Unidade de Apresentação:	Instituto de Química de São Carlos
Departamento:	Química e Física Molecular
Validado em:	01/10/2020

Autor:

Nome: Beatriz Siqueira Ho Unidade: Instituto de Química de São Carlos
Instituição: Universidade de São Paulo

Orientador:

Nome: Carlos Alberto Montanari Instituição: Universidade de São Paulo
Unidade Instituto de Química de São Carlos

Colaborador:

Nome: Fabiana Rosini Instituição: Universidade de São Paulo

Colaborador:

Nome: Rodrigo Cendron Instituição: Universidade de São Paulo

Resumo do Trabalho em português:



DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE AFINIDADE DE INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES

Beatriz Siqueira Ho

Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo

beasho@usp.br

Objetivos

A finalidade desse trabalho é analisar a inibição enzimática promovida por um dado composto, mediante a determinação dos valores da constante de inibição, K_i , e a avaliação dos valores de pK_i . Visando, principalmente, determinar a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a constante de inibição (K_i) de inibidores de catepsina L, sintetizados no grupo NEQUIMED/IQSC/USP, avaliando o potencial de inibição destes frente à catepsina L.

Métodos e Procedimentos

Os ensaios cinéticos enzimáticos para a catepsina L foram realizados a 37°C em 200 µL de uma solução contendo tampão acetato 100 mM (pH 5,5), NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, ditioneitol 5 mM (DTT), 5% v/v dimetilsulfóxido (DMSO), 0,01% v/v Triton X-100 e catepsina L 0,3 nM, usando microplacas de poliestireno pretas com 96 poços de fundo plano. A taxa de velocidade da reação foi monitorada no leitor de placas Biotek Synergy HT através da emissão de fluorescência a 460 nm (excitação a 355 nm) em razão da hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina (Z-FR-AMC).¹ Os inibidores de catepsina L são dissolvidos em uma sequência de diluições e, em seguida, são dispensados nos poços. A reação foi iniciada pela adição de substrato (de concentração igual ao K_m da enzima) e os poços foram monitorados por um total de 5 minutos. Cada ensaio foi realizado em triplicatas para o composto testado. Uma medida de controle na ausência de inibidor (K_m) foi realizada e as constantes de inibição foram calculadas a partir do ajuste não linear das curvas de Michaelis-Menten. O software

SigmaPlot (v. 10.0) foi utilizado no ajuste não linear dos dados e na determinação dos parâmetros cinéticos.

Resultados

Mediante os ensaios fluorimétricos e o devido tratamento dos dados em software específico, determinou-se a inibição da catepsina L frente ao inibidor NEQ570. Além disso, foram realizados ensaios para a determinação da inibição da cruzaina frente ao mesmo inibidor. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1. Inibição de catepsina L e cruzaina frente ao inibidor NEQ570 testados no trabalho

Parâmetros	Enzimas	
	Catepsina L	Cruzaina
pK_i^a	$7,35 \pm 0,0108$	$6,61 \pm 0,0108$
K_i (mol/L)	$4,46 \times 10^{-8}$	$2,37 \times 10^{-7}$
K_m (mol/L)	$5,29 \times 10^{-6} \pm 1,769 \times 10^{-7}$	$2,28 \times 10^{-6} \pm 1,495 \times 10^{-7}$

^a $pK_i = -\log_{10}K_i$

Conclusões

Os resultados obtidos para a constante de inibição do inibidor NEQ570 demonstraram que este possui um alto desempenho na inibição da catepsina L. Apresentando características importantes para seu uso como inibidor enzimático seletivo e potente, vide os altos valores de pK_i adquiridos tanto para a catepsina L quanto para a cruzaina.

Referências Bibliográficas

[1] Burtoloso, A.C., et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. PLoS Negl Trop Dis, 2017.11(2): p. e0005343.