

P 1202**CETI, um inibidor de serino-proteinases obtido de canavalia ensiformes: isolamento, caracterização bioquímica, estrutural e potencial ação anti-inflamatória sobre enzimas de mastócitos**

Pamela Zanon; Júlia Pisco; Letícia de Almeida Brondani; Lucélia Santi; Walter Orlando Beys da Silva; Jonh R. Yates; Renata Ramos; Jorge Almeida Guimarães; Markus Berger - HCPA

Introdução. As serino-proteinases secretadas por mastócitos (principalmente tripsina, quimase e triptase) estão envolvidas em uma série variada de processos fisiopatológicos, incluindo, artrite, asma, aneurisma de aorta e lesões por isquemia-reperusão. Portanto, inibidores farmacológicos dessas enzimas são atrativos principalmente pela aplicação terapêutica em processos inflamatórios. Neste trabalho descrevemos o isolamento e a caracterização bioquímica e estrutural de um novo inibidor de serino-proteinases obtido da semente de *Canavalia ensiformes* capaz de inibir especificamente as enzimas proteolíticas pró-inflamatórias presentes em mastócitos. **Metodologia.** O inibidor foi purificado a partir de um extrato das sementes por métodos de cromatografia líquida. A sequência de aminoácidos foi obtida por espectrometria de massas e o processo de inibição foi caracterizado com substratos sintéticos cromogênicos. **Resultados e Conclusões.** O inibidor (denominado CETI) foi purificado por cromatografia de troca aniônica e afinidade. A sequência de aminoácidos apresentou alta homologia com inibidores do tipo Bowman-Birk sendo rico em cisteínas e apresentando duas alças reativas caracterizadas pela presença de lisina-serina na posição P1-P1' da primeira alça e leucina-serina na posição P1-P1' da segunda alça. Por SDS-PAGE, CETI possui uma única cadeia polipeptídica, com uma massa molecular aparente de 15 kDa, sob condições não redutoras. Entretanto, o inibidor apresentou uma massa acurada de 8173 dáltons determinada por MALDI-TOF, sugerindo que CETI forme dímeros em solução. CETI inibe tripsina (IC50 = 24.69 nM) e quimase (IC50 = 140 nM), mas não inibe trombina, fator Xa, elastase ou calicreína. Diferente de outros Bowman-Birk, CETI não inibe quimotripsina, provavelmente pela ausência de um aminoácido aromático em P1-P1' na segunda alça. É um inibidor não-competitivo de ligação rápida e forte (estequiometria de 1:1) à tripsina (Kiapp = 5.4 X 10⁻⁹ M). CETI é resistente a amplas variações de pH (2-12) e temperatura (25-100°C), mas sensível a agentes redutores devido a presença de pelo menos 7 pontes dissulfeto em sua estrutura. A incubação do inibidor com um extrato proveniente de mastócitos peritoneais estimulados com o composto 48/80 bloqueou a atividade proteolítica de maneira dose-dependente, sugerindo uma possível ação anti-inflamatória. Atualmente estão sendo realizados experimentos para caracterizar a ação do CETI em modelos de inflamação in vivo e em células. **Unitermos:** Serino-proteinases; Mastócitos; Inibidores de proteinases