

# CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DERIVADOS DE BENZOFENONAS FRENTE À SERINO PROTEASE KEX2

Jessica Satie Hosoe<sup>1</sup>; Marcella Araújo Manfredi<sup>2</sup>; Luiz Juliano<sup>3</sup>; Wagner Alves de Souza Júdice<sup>4</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; satii.h@hotmail.com<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Doutorado em Biotecnologia; marcella\_manfredi@hotmail.com<sup>2</sup>

Professor da Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Biofísica;

juliano.biof@epm.br<sup>3</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; wagneras@umc.br<sup>4</sup>

Área do Conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: serino-protease, Kex2, Benzofenonas, Gutiferonas-A

## INTRODUÇÃO

Kex2 ou kexina é uma enzima proteolítica transmembranar,  $\text{Ca}^{2+}$  dependente, descrita originalmente em *Saccharomyces cerevisiae*, pertencente a esse grupo. Constitui o modelo para uma sub-família particular dentro da família das subtilisinas, a sub-família das Kexinas (BRENNER *et al.*, 1994). A enzima foi originalmente caracterizada como a responsável pela transformação do pró-fator- $\alpha$  de acasalamento em fator  $\alpha$  ativo ( $\alpha$ -mating factor), um feromônio responsável pela reprodução sexuada do *S.cerevisiae*, agindo sobre as sequências -SLDKR↓DA- e -PMYKR↓EAEA (BRENNER *et al.*, 1994). Enzimas são alvos terapêuticos extremamente atrativos para o planejamento de novas substâncias bioativas devido ao seu papel essencial nos processos fisiopatológicos, fácil obtenção, adequação para ensaio biológico, e pela facilidade de elaboração de coleções dirigidas de compostos (MANFREDI, 2013). Desta forma, os inibidores enzimáticos são substâncias químicas capazes de reduzir a velocidade de reações catalisadas por enzimas (COPELAND, 2000). As Benzofenonas apresentam grupamentos hidroxila, duplas ligações, grupo carbonila, que podem ser modificados quimicamente para se obter efeitos sobre a lipofilicidade, hidrofobicidade, densidade eletrônica e ligações de hidrogênio (CALIXTO, 2001). Esses compostos demonstraram ter um efeito inibitório sobre as proteases trazendo resultados experimentais que podem ser relacionados com certos motivos estruturais estimados cristalograficamente, possibilitando assim relações entre estruturas químicas dos compostos testados e a atividade anti-proteolítica, que são suportadas por ensaios computacionais dos inibidores no alvo macromolecular (MARTINS, 2008).

## OBJETIVOS

Caracterizar moléculas derivadas de benzofenonas da classe da Gutiferonas-A como potenciais inibidores específicos da serino protease Kex2 determinando seus potenciais inibitórios  $\text{IC}_{50}$ , determinação do mecanismo de inibição dos melhores compostos e determinação das constantes de inibição  $\text{K}_i$ .

## METODOLOGIA

A enzima kex2 utilizada nos ensaios foram gentilmente cedida pelo Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP. Substratos sintéticos Abz-peptidil-EDDnp foram em partes fornecidos pela colaboração com a Prof. Dra. Maria

Aparecida Juliano do departamento de biofísica UNIFESP-INFAR. Os compostos sintéticos derivados de benzofenonas da classe das gutiferonas-A, candidatos a inibidores, foram cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos da Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química – CCE. O valor de  $IC_{50}$  é definido pela concentração de inibidor responsável por provocar uma queda de 50% na atividade da enzima. O valor de 50% é apenas uma convenção criada com o objetivo de se comparar valores de potência de inibidores entre si. Os ensaios de inibição para determinação dos valores de  $IC_{50}$  foram realizados tampão em Bis-Tris 200mM, 0,01% de Tritox X-100, 1mM de  $CaCl_2$ , pH 7 em cubeta de cristal de quartzo de 1 mL. Os parâmetros cinéticos foram determinados usando o programa Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltda). Após os ensaios de determinação dos valores de  $IC_{50}$ , os compostos mais ativos foram submetidos aos ensaios cinéticos para determinação do mecanismo de ação e consequentemente obtenção dos valores de  $K_i$ . A escolha das concentrações de inibidor foi feita com base nos valores de  $IC_{50}$ , optando-se inicialmente pelas concentrações de metade e o dobro do valor de  $IC_{50}$ . Os dados coletados deram origem aos gráficos de duplo-recíprocos (plote de Lineweaver-Burk) e através do padrão de intersecção das curvas no plano de coordenadas cartesianas, foi possível determinar o mecanismo de ação. Com os mesmos dados foi possível determinar a constante de dissociação do complexo E•I (enzima-inibidor), através de gráfico da razão entre  $K_m$  aparente e  $V_{máx}$  observados em função da concentração de inibidor.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de inibição foram realizados com 10 compostos derivados de Benzofenonas da classe das Gutiferonas, de acordo com métodos apresentados previamente. Concentrações crescentes dos compostos foram adicionadas para promover o decaimento da atividade enzimática possibilitando o plote de gráficos de inibição. Os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 1, fornecendo valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ).

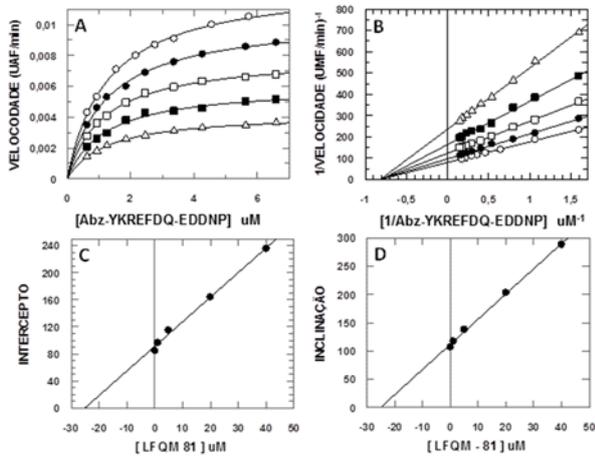
**Tabela 1:** Valores de  $IC_{50}$  da enzima Kex2 frente aos compostos derivados de benzofenonas.

INIBIDOR	RESULTADOS $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	INIBIDOR	RESULTADOS $IC_{50}$ ( $\mu M$ )
LFQM79	119,28 $\pm$ 2,16	LFQM114	31,47 $\pm$ 1,50
LFQM80	44,63 $\pm$ 4,66	LFQM126	71,69 $\pm$ 2,95
LFQM81	13,92 $\pm$ 0,571	LFQM127	43,48 $\pm$ 2,49
LFQM82	16,15 $\pm$ 0,82	LFQM128	10,48 $\pm$ 0,46
LFQM113	8,12 $\pm$ 0,32	LFQM129	37,88 $\pm$ 3,28

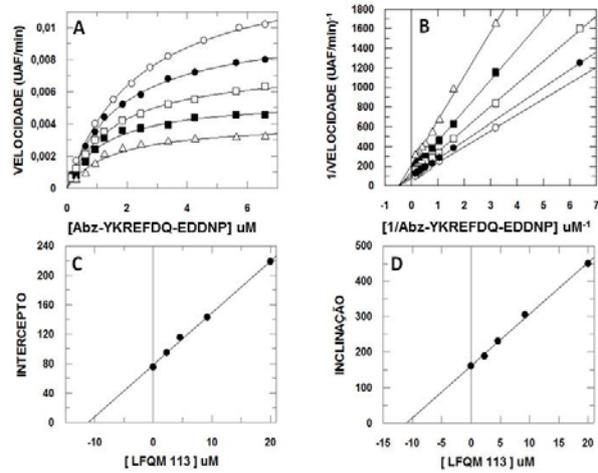
A partir dos dados de  $IC_{50}$ , foram determinadas as constantes de inibição  $K_i$  e mecanismo de inibição, para os compostos LFQM 81, LFQM 113 e LFQM 128.

De acordo com esses dados, todos os compostos com análise de mecanismo de inibição são inibidores não-competitivos e que se ligam com a mesma afinidade tanto à enzima livre quanto o complexo ES, uma vez que  $\alpha = 1$ , estabelecendo o mecanismo de inibição proposto na Figura 4.

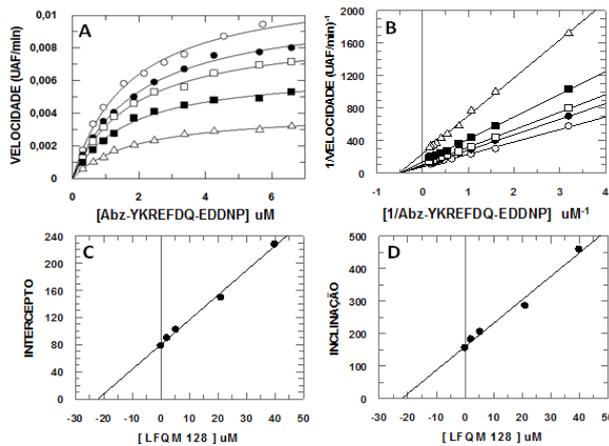
**Figura 1** – Cinética de Michaelis-Menten para a determinação do  $K_i$  e o mecanismo de inibição da enzima Kex2 pelo composto LFQM 81 nas concentrações de zero ( $\circ$ ), 1,11  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), 5  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), 20  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) e 40  $\mu\text{M}$  ( $\triangle$ ).



**Figura 2** - Cinética de Michaelis-Menten para a determinação do  $K_i$  e o mecanismo de inibição da enzima Kex2 pelo composto LFQM 113 nas concentrações de zero ( $\circ$ ), 2,31  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), 4,61  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), 9,25  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) e 20  $\mu\text{M}$  ( $\triangle$ ).

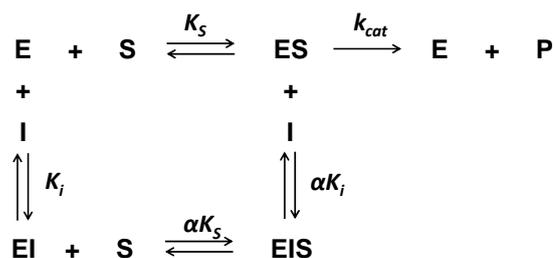


**Figura 3** – Cinética de Michaelis-Menten para a determinação do  $K_i$  e o mecanismo de inibição da enzima Kex2 pelo composto LFQM 128 nas concentrações de zero ( $\circ$ ), 2,09  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ), 5,25  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), 21  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) e 39,88  $\mu\text{M}$  ( $\triangle$ ).



**Tabela 2** – Valores de  $K_i$  e  $\alpha K_i$  da inibição da Kex2 pelos compostos derivados de Gutiferon-A.

Gutiferonas-A	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\alpha K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
LFQM 81	$25,1 \pm 0,05$	$25,1 \pm 0,8$
LFQM 113	$11,03 \pm 0,76$	$11,09 \pm 0,54$
LFQM 128	$21,4 \pm 0,6$	$21,7 \pm 0,5$



**Figura 4** – Mecanismo de inibição proposto para os compostos LFQM 81, 113 e 128.

K<sub>i</sub> determinado a partir do replote da inclinação em função da concentração do composto e o αK<sub>i</sub> determinado a partir do replote do intercepto em função da concentração do composto. Para todos os compostos testados α = 1.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nos experimentos de triagem (IC<sub>50</sub>), as Benzofonenas sintéticas da classe da Gutiferon-A foram bons inibidores para a Kex2. Os compostos LFQM 81, LFQM 113 e LFQM 128 apresentaram os melhores valores sendo 13,92 ± 0,571 μM, 8,12 ± 0,32 μM e 10,48 ± 0,46 μM, respectivamente. Com esses dados, foi determinado as constantes de inibição e mecanismo de inibição para estes compostos, concluindo através das constantes K<sub>i</sub> e αK<sub>i</sub> que o LFQM 113 é o mais potente na inibição da Kex2, sendo 2,3 e 2 com maior afinidade à enzima que os LFQM 81 e 128. Os três compostos que tiveram o mecanismo proposto, apresentaram uma inibição do tipo não-competitivo, mostrando que se ligam com a mesma afinidade tanto à enzima livre quanto o complexo ES.

**AGRADECIMENTOS:** FAEP, FAPESP, CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRENNER, C.; BEVAN, A.; FULLER, R. S. *Methods Enzymol.*, v. 244, p. 152-167, 1994.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

COPELAND, R. A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**. New Jersey, Wiley, 2005.

MANFREDI, M.A. **Identificação e caracterização de compostos inibidores de cisteíno proteases lisossomais**. Mogi das Cruzes, 2013. Dissertação - Universidade Mogi das Cruzes.

MARTINS, F.T.; ASSIS, D.M.; SANTOS, M.H.; CAMPS, I.; VELOSO, M.P.; JULIANO, M.A.; ALVES, L.C.; DORIGUETTO, A.C. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1230-1239, 2009.