

BENZOFENONAS E BIFLAVONÓIDES COMO INIBIDORES DE PRÓ PROTEÍNAS CONVERTASES

Gerson Profeta de Souza¹, Thiago Mendes Sansevero²; Luiz Juliano³; Marcelo Henrique dos Santos⁴; Wagner Alves de Souza Judice⁵

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: gerson.profeta@hotmail.com¹

Mestrando do Programa em Biotecnologia da UMC; tmsansevero@hotmail.com²

Professor/pesquisador da UNIFESP; ljuliano@terra.com.br³

Professor-pesquisador da UNIFAL; marcelo_hs@yahoo.com.br⁴

Professor-pesquisador da UMC; e-mail: wagneras@umc.br⁵

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: kexina (kex2), PC1, Inibidores, Benzofenonas, Biflavonóides

INTRODUÇÃO

As serino-proteases constituem atualmente o maior e mais bem caracterizado grupo de enzimas proteolíticas, alguns exemplos são elastase, calicreína, tripsina e subtilisina, sendo esta última constituída pelas proteínas convertases furina, PC2, PC1/3, PACE4, PC4, PC5/6, PC7 e Kexina (Kex2). As Pró Proteínas Convertases funcionam no ramo regulatório ou constitutivo da via secretória, e uma característica funcional comum a essas proteases é a ativação de precursores de polipeptídeos biologicamente ativos ou a ativação de precursores de proteínas secretadas ou transmembranais, através da hidrólise seletiva após um par de resíduos de aminoácidos básicos Lys(Arg)/Arg(Lys). O mecanismo catalítico das serino-proteases é baseado na catalise do sítio ativo, o qual é constituído por três aminoácidos invariáveis: a serina que funciona como um grupo nucleofílico, o aspartato, como um grupo eletrofílico e a histidina atuando como base. Este mecanismo inicia-se com o ataque nucleofílico do grupo hidroxil da serina do sítio ativo sobre o átomo de carbono da carboxila da ligação peptídica, catalisado pelo resíduo de histidina. Essas proteases estão envolvidas na maturação de um amplo número de precursores proteicos inativos, os quais participam em diversos processos fisiológicos além de processos patológico como em inúmeras infecções, aterosclerose, diabetes, tumorigenese e desordem neurodegenerativas.

OBJETIVO

O presente projeto de iniciação científica visa estudar o comportamento de Pró-proteínas convertases frente a possíveis moléculas inibidoras derivadas de benzofenonas e biflavonóides (flavonóides diméricos), que são moléculas naturais que foram quimicamente modificadas.

METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados em tampão Bis/tris 200 mM, CaCl₂ 2 mM, KCl 150 mM, 0,01% Triton, pH 6.5 a 35°C em espectrofluorímetro Hitachi F2500, termostaticado, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho ótico de 10 mm com volume de 1 mL sob agitação constante. A percepção das hidrólises foi realizada através de medição da fluorescência utilizando os substratos Abz-RSKRSALRDQ-EDDnp para PC1 e Abz-YKREFREADQ-EDDnp para Kex2 como sondas fluorescentes onde ABZ (ácido orto-aminobenzóico) corresponde ao grupo fluorescente e EDDnp (etileno-dinitro-fenol) ao grupo apagador, submetidos ao comprimento de onda de excitação de 320 nm e o produto da hidrólise foi acompanhado em comprimento de onda de emissão de 420 nm.

Posteriormente à adição do substrato e medição da atividade enzimática na ausência de inibidor obtendo-se a velocidade inicial da reação, adicionou-se inibidor aumentando sua concentração gradativamente até a estabilização da redução na atividade enzimática. Os dados obtidos foram analisados no programa Gravit 5.0 e os valores de IC₅₀ determinados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de IC₅₀ das benzofenonas para a Kex2 variaram entre 6 à 105uM e para PC1 variaram entre 0,6 à 0,8uM (Tabela 1). Para os compostos biflavonóides os IC₅₀s ficaram entre 4,5 à 85uM para Kex2 e entre 1,1 à 3,6uM para PC1 (Tabela 2). O composto VG0 (biflavonóide) e LFQM-119 (benzofenona) foram os melhores inibidores. No caso da protease PC1, os compostos VG4 (biflavonóide) e LFQM-114 (benzofenona) foram os mais efetivos na inibição.

TABELA 1. Valores de IC₅₀ determinados para as enzimas Kex2 e PC1 frente a compostos benzofenônicos.

Benzofenonas	IC ₅₀ (uM)	
	Kex2	PC1
CM-a	8,6 ± 0,4	0,71 ± 0,04
CM-b	11 ± 1	0,79 ± 0,03
LFQM-113	24 ± 2	0,62 ± 0,06
LFQM-114	27 ± 4	0,59 ± 0,06
LFQM-115	105 ± 15	0,59 ± 0,04
LFQM-119	5 ± 1	0,76 ± 0,04
LFQM-120	11 ± 1	0,68 ± 0,04
LFQM-121	10 ± 1	0,65 ± 0,07

TABELA 2. Valores de IC₅₀ determinados para as enzimas Kex2 e PC1 frente a compostos biflavonóides.

Biflavonóides	IC ₅₀ (uM)	
	Kex2	PC1
VG0	4,5 ± 0,4	3,6 ± 0,4
VG1	56 ± 3	1,45 ± 0,09
VG3	49 ± 2	1,39 ± 0,06
VG4	86 ± 8	1,14 ± 0,07

CONCLUSÕES

De acordo com os dados de IC₅₀ obtidos, os compostos benzofenônicos foram pelo menos 130 vezes mais efetivos na inibição da PC1 do que a Kex2. A variação molecular das estruturas das benzofenonas ou não são relevantes na ligação do composto à enzima ou os subsítios da PC1 onde há interação enzima-inibidor são pequenos o suficiente permitindo um eficiente processo de ligação e inibição o que é verificado pelos baixos valores de IC₅₀, todos abaixo de 0,8 uM (0,6 à 0,8 uM). A literatura menciona que alguns subsítios da Kex2 são pequenas reentrâncias na superfície da enzima. Em função dessas informações é possível que, devido a essa menor definição estrutural dos subsítios estabeleça-se maiores interações com a Kex2 e conseqüentemente, as modificações nos compostos benzofenônicos possam ser mais identificadas do que na PC1, devido a uma maior superfície de contato entre os aminoácidos desses subsítios,

entretanto, isso não reflete uma maior eficiência na inibição o que é verificado pelos elevados valores de IC₅₀ da Kex2 comparativamente a PC1.

Como não há na literatura a estrutura da PC1, somente da Kex2, pretendemos futuramente realizar estudos de acoplamento da Kex2 com benzofenonas e biflavonóides para definição dos possíveis modelos de interação Kex2-inibidor para confirmação ou não das hipóteses aqui levantadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. **Methods Enzymol.**, v.244, p.1-15, 1994.

POLGÁR, L; HALÁSZ, P. Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteinases. **Biochem J.**, v. 207, n. 1, p.1-10, 1982.

FULLER, R.S; STERNE, R.E., and THORNER, J. (1988) **Annu. Rev. Physiol.** 50, 345-362.

SEIDAH, N.G.; MBIKAY, M.; MARCINKIEWICS, M., and CHRÉTIEN, M. (1998) **in Proteolytic and Cellular Mechanisms in Prohormone Processing** (Hook, V., ed.) pp. 49-76, RG Landes, Georgetown.

DE BIE, I; MARCINKIEWICS, M; MALIDE, D; LAZUNE, C; NAKAYAMA, K; BENDAYAN, M., and SEIDAH, N.G. (1996) **J. Cell. Biol.** 135, 1261-1275.

BRENNER, C; BEVAN, A., and FULLER, R.S. (1994). **Methods Enzymol.** 244:152-167, 152-167.

SEIDAH, N.G. and Chrétien, M. (1994). **Methods Enzymol.** 244:175-88, 175-188.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995- 2018, 1998.

MARTINS, F.T.; ASSIS, D.M.; SANTOS, M.H.; CAMPS, I.; VELOSO, M.P.; JULIANO, M.A.; ALVES, L.C.; DORIGUETTO, A.C. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1230–1239, 2009.