

# DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS INIBIDORES DERIVADOS DE BENZOFENONAS E BIFLAVONÓIDES SOBRE AS CONVERTASES KEX2, FURINA E PC1.

Gerson Profeta de Souza<sup>1</sup>; Jéssica Aparecida da Silva Pereira<sup>2</sup>; Marcelo Yudi Icimoto<sup>3</sup>; Vitor Oliveira<sup>4</sup>; Wagner Alves de Souza Judice<sup>5</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: gerson.profeta@hotmail.com<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: jsa\_pereira@hotmail.com<sup>2</sup>

Estudante de Doutorado da UNIFESP- Departamento de Biofísica<sup>3</sup>

Professor da UNIFESP- Departamento de Biofísica<sup>4</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com<sup>5</sup>

Área de Conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Enzimas de Processamento, Benzofenonas, Biflavonóides.

## INTRODUÇÃO

Pró-proteínas convertases (PCs) pertencem à família das endoproteases cálcio dependente, e apresentam papéis principais no processamento de precursores proteicos inativos convertendo-os às suas formas maduras bioativas que estão envolvidas em uma ampla variedade de doenças incluindo câncer, infecções virais, infecções bacterianas, disfunções metabólicas como diabetes e dislipidemias. Muitos peptídeos bioativos são gerados através da transformação proteolítica de seus precursores, que são ativados através do processamento pós-transcricional. Esse processo é realizado pelas enzimas Pró-Proteínas convertases (ou pró-hormônios convertases), que fazem parte da família de enzimas intracelulares, as quais agem clivando pares de resíduos de aminoácidos básicos. Nos eucariotos, diversas proteínas que passam pela via secretória são sintetizadas como pró-proteínas e sofrem endo ou exo-proteólise. São exemplos clássicos alguns fatores secretados como a insulina. Algumas proteínas de membrana podem sofrer esse tipo de processamento, como é o caso do receptor da insulina ou a proteína gp 160 do HIV (FULLER *et al*, 1988; ROUILLE *et al*, 1995; SEIDAH e CHRETIEN, 1994). Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. É conhecido que compostos derivados de flavonóides possuem atividades anti-inflamatórias e de efeito vasodilatador, ação antialérgica, atividade anti-neoplásica, hepatoprotetora, anti-ulcerogênica, inibição da agregação plaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (PETERSON, e DWYER, 1998). Além dos biflavonóides, dados na literatura mostram benzofenonas naturais polipreniladas sendo capazes de inibir as cisteíno proteases catepsina B e papaína e as serino proteases catepsina G e tripsina.

## OBJETIVOS

Estudar o comportamento da pró-proteína convertase Furina frente a possíveis moléculas inibidoras derivadas de benzofenonas e biflavonóides e a determinação do mecanismo de ação dos inibidores sobre as convertases KEX2, FURINA, e PC1.

## METODOLOGIA

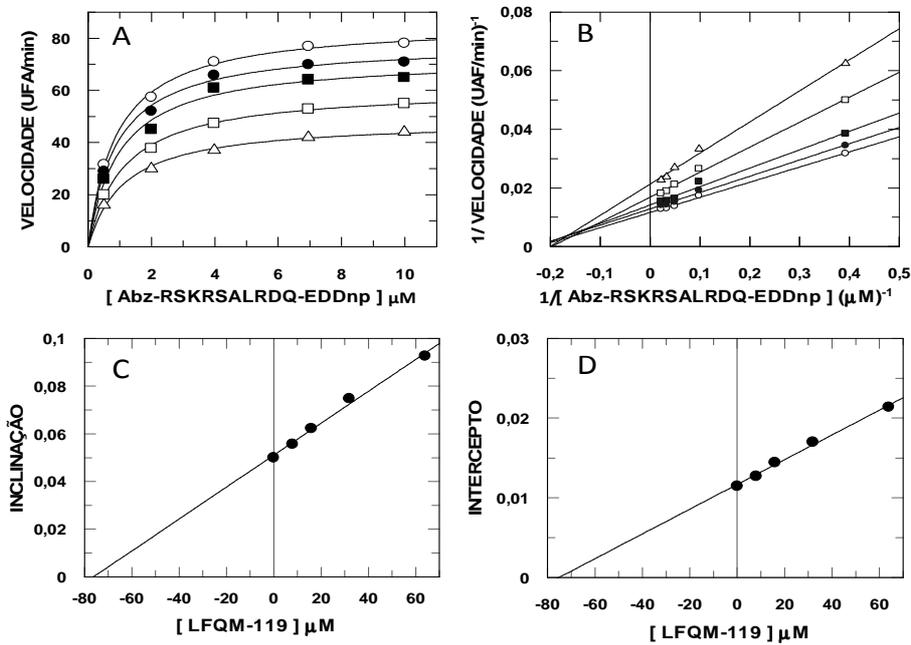
Os ensaios de inibição das proteases PC1 e Kex2 foram realizados em tampão Bis/tris 200 mM, CaCl<sup>2+</sup> 2 mM, KCl 150 mM, 0,01% Triton, pH 6,5 e para Furina utilizou-se

tampão 10mM MES, 1mM  $\text{CaCl}_2^{2+}$ , 0,01% Triton, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 6,5 em espectrofluorímetro Hitachi F2500, termostaticado a 35°C, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho ótico de 10 mm com volume de 1 mL sob agitação constante. A percepção das hidrólises foi possível devido à medição da fluorescência utilizando-se substratos fluorogênicos (gentilmente cedidos pela prof. Dra. Maria Aparecida Juliano do departamento de biofísica UNIFESP-INFAR) 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 que não houvesse redução na atividade enzimática. Com os dados adquiridos foi possível calcular o  $\text{IC}_{50}$  através do programa Grafit 5.0, o valor obtido corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%. Após os ensaios de determinação dos valores de  $\text{IC}_{50}$ , os compostos mais ativos foram submetidos aos ensaios cinéticos para determinação do mecanismo de ação e consequentemente obtenção dos valores de  $K_i$ . O método experimental consiste em medir a velocidade de reação na ausência e na presença de concentrações diferentes de inibidor, com variação das concentrações de substrato até a saturação do ensaio enzimático. Os dados coletados originam gráficos de duplo-recíprocos e através do padrão de intersecção das retas no plano de coordenadas cartesianas, torna-se possível determinar o mecanismo de ação.

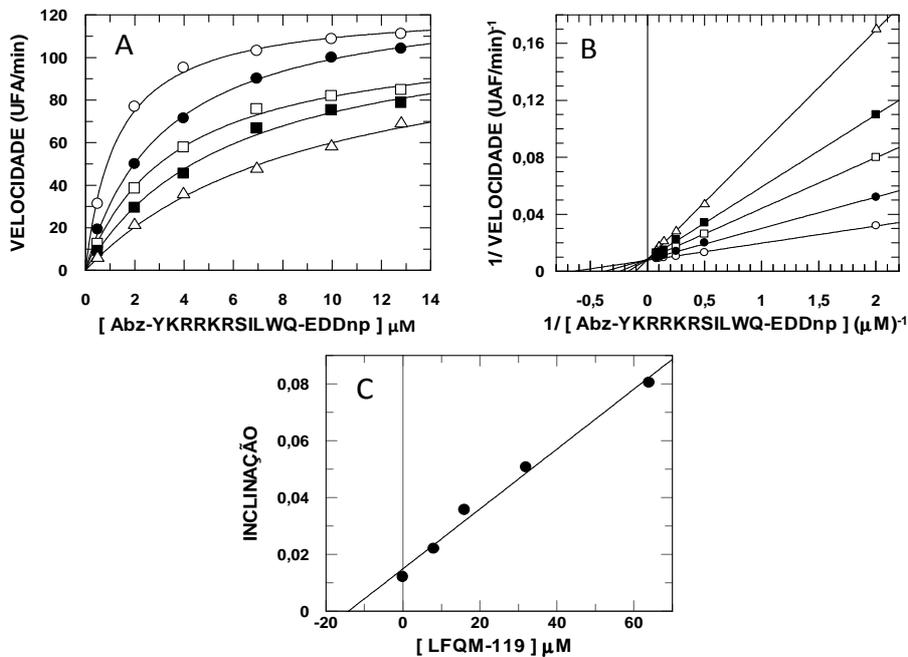
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 (A-D) apresenta os dados das cinéticas de inibição da enzima PC1 pelo composto benzofenona LFQM-119, este atua na catálise da enzima de processamento Kex2 e PC1 do mesmo modo, apresentando inibição não-competitiva linear simples. De acordo com os dados obtidos de inclinações e interceptos, observamos as retas interseccionando o eixo X praticamente no mesmo ponto determinando um  $K_i = \alpha K_i$ , desta forma verificamos que o composto LFQM-119 apresenta a mesma afinidade tanto pela enzima livre quanto com o complexo bimolecular ES, estabelecendo assim  $\alpha=1$ , dessa forma, tal composto comporta-se como um inibidor não-competitivo linear simples. Diferentemente disso, na inibição da Furina, os resultados (figura 2 A-C) mostram que esta molécula atua como um inibidor competitivo, na qual as retas interseccionam o eixo Y em um mesmo ponto de  $1/V_{\text{max}}$ . Em função disso, não se obtém o replote dos interceptos, sendo possível construir apenas o replote das inclinações, a partir do qual determinou-se o valor de  $K_i = 14 \pm 3 \mu\text{M}$ , podendo-se assumir que  $\alpha \rightarrow \infty$ . Estes dados permitiram estabelecer o mecanismo no qual temos que o composto LFQM-119 liga-se especificamente à enzima livre Furina definindo uma inibição competitiva linear simples.

**Figura 1-** Cinética de Michaelis-Mentem para a determinação do  $K_i$  e mecanismo de inibição da enzima de processamento PC1 pelo composto LFQM-119. **A** - Plote de Michaelis-Mentem: Velocidade reacional versus concentração de substrato. **B** - Plote dos duplos recíprocos (Lineweaver-Burk). **C** - Replote da Inclinação versus a concentração de LFQM-119. **D** - Replote do Intercepto versus a concentração de LFQM-119.



**Figura 2-** Cinética de Michaelis-Mentem para a determinação do  $K_i$  e mecanismo de inibição da enzima de processamento Furina pelo composto LFQM-119. **A** - Plote de Michaelis-Mentem: Velocidade reacional versus concentração de substrato. **B** - Plote dos duplos recíprocos (Lineweaver-Burk). **C** - Replote da Inclinação versus a concentração de LFQM-119.



De acordo com os resultados obtidos do composto VG0 frente a PC1, determinamos os valores de  $K_i = 9,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$  e  $\alpha K_i = 34 \pm 4 \mu\text{M}$ , estabelecendo assim um valor de  $\alpha = 3,7$ . Dessa forma, verificamos que neste mecanismo de inibição não-competitivo do tipo misto, com  $\alpha \neq 1$  e portanto, o inibidor liga-se preferencialmente (3,7 vezes mais) à enzima livre E do que ao complexo ES. Igualmente aos resultados obtidos na inibição da PC1 pelo biflavonóide VG0, a inibição da Kex2 por esta molécula, apresentou o mesmo perfil de inibição, os replotes das inclinações e dos interceptos definiram que a molécula VG0 preferencialmente liga-se à enzima livre do que ao complexo ES, pois a constante de inibição  $K_i = 20 \pm 2 \mu\text{M}$ , correlaciona-se à afinidade da enzima livre, enquanto que  $\alpha K_i = 62 \pm 5 \mu\text{M}$ , correlaciona-se à afinidade da enzima ao complexo ES. Sendo  $\alpha = 3,1$  que corresponde ao grau de afinidade do composto VG0 em ligar-se preferencialmente à enzima livre Kex2, Analisando ao plote dos inversos ou Lineweaver-Burk do biflavonóide VG0 frente a enzima de processamento Furina, verificamos que todas as retas interseccionam em um mesmo ponto do eixo Y, igualmente ao observado na inibição da Furina pelo composto LFQM-119. O plote dos inversos permitiu a construção apenas do plote das inclinações, o qual foi possível determinar o valor da constante de inibição  $K_i = 2,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . As informações obtidas permitiram estabelecer que o composto VG0 na inibição da Furina apresenta um mecanismo de inibição competitivo linear simples, no qual esse biflavonóide liga-se exclusivamente à enzima livre.

## CONCLUSÕES

Com o avanço nessa linha de pesquisa, pode-se afirmar que novos estudos devem ser realizados, uma vez que a ampla diversidade estrutural desses compostos, bem como a capacidade de interação com outras substâncias, nos reporta a imaginar que novas descobertas ainda podem e devem ser realizadas. O desenvolvimento de novos fármacos visando essas enzimas de processamento como alvo de novas drogas poderia surgir da modificação química de compostos naturais como os biflavonóides ou de compostos sintéticos como as benzofenonas. Além disso, os baixos valores de  $IC_{50}$  de alguns compostos os tornam moléculas interessantes também no desenvolvimento de fármacos para essa enzima de processamento uma vez que muitas das enzimas de processamento estão envolvidas no processamento de toxinas tanto virais quanto bacterianas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FULLER, R.S.; STERNE, R.E.; THORNER, J. Enzymes required for yeast prohormone processing. **Annual Review of Psychology**, v.50, p.345-362, 1988.

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

ROUILLE, Y., DUGUAY, S.J., LUND, K., FURUTA, M., GONG, Q., LIPKIND, G., OLIVA, A.A.J., CHAN, S.J., STEINER, D.F. **Front. Neuroendocrinol.** v.16, p.322-361, 1995.

SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., DAY, R. **Biochimie** v. 76, p. 197-209, 1994.