

## **Caracterização de Inibidores Sobre a Enzima de Processamento Furina**

**Gerson Profeta de Souza<sup>1</sup>; Jéssica Aparecida da Silva Pereira<sup>1</sup>  
Wagner Alves de Souza Judice<sup>1</sup>;**

<sup>1</sup>Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) – Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB)  
Av. Candido Xavier de Almeida Souza, 200 – CEP 08780-911 – Mogi das Cruzes – SP  
e-mail: gerson.profeta@hotmail.com

### **RESUMO**

*As Pró-Proteínas Convertases funcionam no ramo regulatório ou constitutivo da via secretória, onde participam da ativação de precursores de proteínas secretadas ou transmembranais, através da hidrólise após um par de resíduos de aminoácidos básicos Lys(Arg)/Arg(Lys). Estas proteases estão envolvidas na maturação de um amplo número de precursores proteicos inativos, os quais participam em diversos processos fisiológicos e patológicos. A realização de ensaios de inibição utilizando a enzima Furina gerou valores de  $IC_{50}$  que variaram entre 0,6-10,8 $\mu$ M utilizando-se benzofenonas e  $IC_{50}$  entre 2,79-16,8 $\mu$ M para biflavonoides. Os compostos VG0 e LFQM-119 foram submetidos a determinação do mecanismo de inibição, onde ambos os compostos apresentaram mecanismo de inibição competitivo, sendo os valores obtidos de  $K_i=14\mu$ M para LFQM-119 e  $K_i=2,4\mu$ M para o biflavonoide VG0, podendo-se assumir que  $\alpha \rightarrow \infty$ .*

**Palavras-chave:** Furina, Benzofenonas, Biflavonóides.

### **INTRODUÇÃO**

Pró-proteínas convertases (PCs) pertencem à família das endoproteases cálcio dependente, estas enzimas apresentam papéis principais no processamento de precursores proteicos inativos produzindo 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, essas endoproteases agem clivando resíduos de aminoácidos básicos.

Até o momento, é comprovada a presença de sete pró-proteínas convertases em mamíferos, sendo elas PC1/PC3, PC2, PACE4, PC4, PC5/PC6, PC7/PC8/LPC/SPC7/PQP1 e Furina <sup>(1)</sup>. As SPCs (subtilisin-like proprotein convertases) de mamíferos funcionam ou no ramo regulatório ou constitutivo da via secretória. As convertases PC2 e PC1/3 são as principais formas expressas no sistema neuroendócrino e cerebral, onde elas agem sobre pró-hormônios e precursores neuropeptídicos em vesículas pela via secretória <sup>(2)</sup>.

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 <sup>(3,4,5)</sup>.



**III SIMBBTEC**  
Londrina 2013

## Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

A especificidade das enzimas proteolíticas depende de vários fatores e, no caso das enzimas de processamento intracelular, há compartimentalização intracelular, permitindo assim a co-localização com o substrato, limitando sem dúvida a variedade de moléculas expostas à ação enzimática, juntamente com as condições reguláveis do meio.

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. São consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta humana regular, comumente encontrados em legumes, vegetais, frutas, sementes, mel, entre outros produtos de consumo cotidiano. 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<sup>(6)</sup>.

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. Dessa forma, tais compostos apresentam potencial uso em drogas anti-proteolíticas no tratamento de doenças nas quais proteases estejam envolvidas, como tumores crônicos<sup>(7)</sup>. Testes *in vitro* mostraram que as benzofenonas inibem o desenvolvimento do vírus HIV. Além disso, estas já foram relatadas como indutoras de apoptose em células de leucemia humana<sup>(8)</sup>. Desta forma o objetivo deste trabalho é definição não somente de inibidores para a furina, mas também a elucidação do mecanismo com que esta ocorre.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de inibição da protease Furina foram realizados em tampão 10mM MES, 1mM CaCl<sup>2+</sup>, 0,01% Triton, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5. A percepção das hidrólises foi possível devido à medição da fluorescência utilizando-se o substrato Abz-YFRRKRSILWQ-EDDnp, 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. Os ensaios enzimáticos foram realizados em espectrofluorímetro Hitachi F2500. Posteriormente à adição do substrato e medição da atividade enzimática na ausência de inibidor, obteve-se a velocidade inicial da reação, adicionou-se inibidor aumentando sua concentração gradativamente até que não houvesse redução na atividade enzimática (estabilização da reação). Com os dados adquiridos foi possível calcular o IC<sub>50</sub> através do programa Grafit 5.0, o valor obtido corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%. Para realização dos ensaios de inibição utilizou-se o método de linearização de Lineweaver-Burk, onde o método experimental consiste em medir a velocidade de reação na ausência e presença de diferentes concentrações de inibidor, com variação das concentrações de substrato até a saturação do ensaio enzimático. A escolha das concentrações de inibidor foi realizada com base nos valores de IC<sub>50</sub>, optando-se inicialmente pelas concentrações de metade e o dobro do valor de deste. Os dados coletados originam gráficos de duplo-recíprocos e através do padrão de intersecção das retas no plano de coordenadas cartesianas, tornou-se possível determinar o mecanismo de inibição.

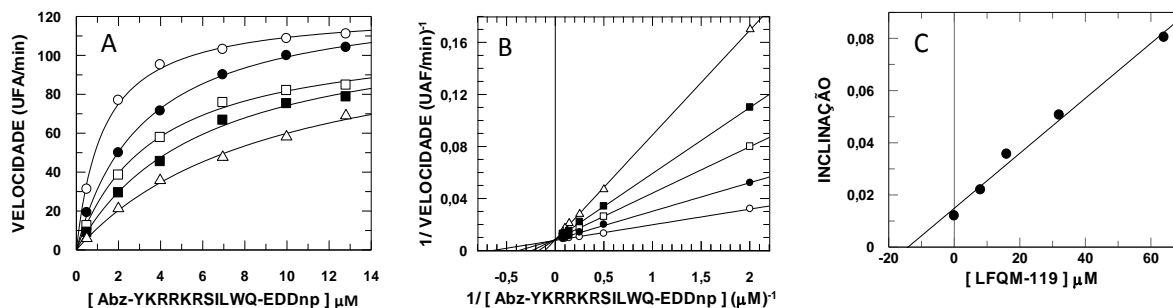
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de IC<sub>50</sub> variaram entre 0,6-10,8μM utilizando-se benzofenonas e entre 2,79-16,8μM para biflavonoides A partir destes valores foi possível determinar quais os compostos mais ativos



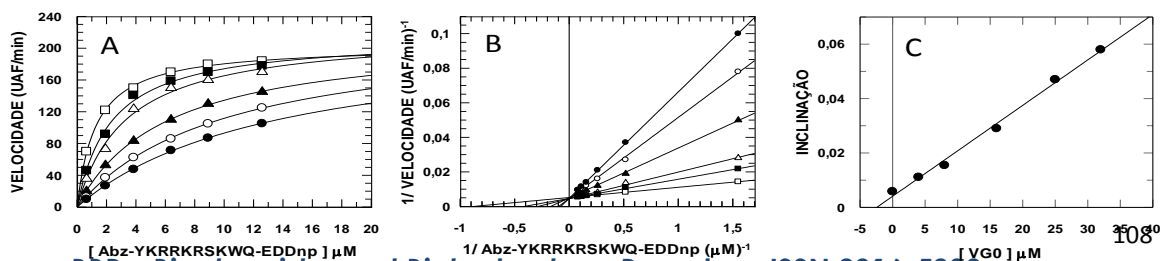
e estes foram submetidos a ensaios cinéticos para determinação do mecanismo de inibição, e consequente obtenção dos valores de  $K_i$ . Os resultados obtidos na inibição da enzima de processamento Furina, mostram que a molécula LFQM-119 atua como um inibidor competitivo na qual as retas interseccionam o eixo Y em um mesmo ponto de  $1/V_{max}$ . Em função disso não se obtém o replote dos interceptos sendo possível construir apenas o replote das inclinações e a partir deste 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 proposto no Esquema 1 no qual temos que o composto LFQM-119 liga-se seletivamente à enzima livre Furina definindo uma inibição competitiva linear simples.

**Figura 1** - Cinética de Michaelis-Menten para a determinação do  $K_i$  e mecanismo de inibição da enzima de processamento Furina pelo composto VG0. **A:** Plote de Michaelis-Menten: Velocidade reacional versus concentração de substrato. **B:** Plote dos duplos recíprocos (Lineweaver-Burk). **C:** Replote da Inclinação versus a concentração de LFQM-119

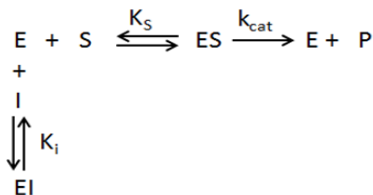


Experimentos realizados mostraram supressão da fluorescência do grupo fluorescente Abz (ácido orto-aminobenzóico) frente ao composto biflavonóide VG0. Não se verificou efeito da supressão deste grupo fluorescente pelos compostos da classe da benzofenona, os dados coletados foram utilizados para efetuarem-se as correções das velocidades máximas das cinéticas tanto na determinação do potencial inibitório  $IC_{50}$  quanto à determinação das constantes de inibição  $K_i$ . Os resultados obtidos na inibição da Furina pelo biflavonóide VG0, apresentou o perfil de inibição competitiva, onde 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 cujo mecanismo proposto está de acordo com o apresentado no Esquema 1

**Figura 2** - Cinética de Michaelis-Menten para a determinação do  $K_i$  e mecanismo de inibição da enzima de processamento Furina pelo composto VG0. **A:** Plote de Michaelis-Menten: Velocidade reacional versus concentração de substrato. **B:** Plote dos duplos recíprocos (Lineweaver-Burk). **C:** Replote da Inclinação versus a concentração de VG0.



**Esquema 1 – A:** Mecanismo de Inibição proposto para o composto LFQM-119 e VG0 atuando na catálise da enzima de processamento Furina.



### 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 a FURINA 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<sub>50</sub> de alguns compostos os tornam moléculas interessantes também no desenvolvimento de fármacos para essa enzima de processamento.

### REFERÊNCIAS

- (1) FULLER, R.S.; STERNE, R.E.; THORNER, J. Enzymes required for yeast prohormone processing. **Annual Review of Psychology**, v.50, p.345-362, 1988.
- (2) SEIDAH, N.G., MBIKAY, M., MARCINKIEWICS, M., CHRÉTIEN, M. **In Proteolytic and Cellular Mechanisms in Prohormone Processing**. Ed. Hook, p.49-76, RG Landes, Georgetown, 1998.
- (3) DE BIE, I., MARCINKIEWICS, M., MALIDE, D., LAZUNE, C., NAKAYAMA, K., BENDAYAN, M., SEIDAH, N.G. The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. **The Journal of Cell Biology**, n. 135, p. 1261-1275, 1996.
- (4) ROUILLE, Y., DUGUAY, S.J., LUND, K., FURUTA, M., GONG, Q., LIPKIND, G., OLIVA, A.A.J., CHAN, S.J., STEINER, D.F. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases **Frontiers in Neuroendocrinology**. v.16, p.322-361, 1995.
- (5) SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M., DAY, R. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions **Biochimie** v. 76, p. 197-209, 1994.
- (6) PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1995- 2018, 1998.
- (7) MARTINS, F.T.; ASSIS, D.M.; SANTOS, M.H.; CAMPS, I.; VELOSO, M.P.; JULIANO, M.A.; ALVES, L.C. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1230–1239, 2009.
- (8) MATSUMOTO, K.; KOBAYASHI, E.; ITO, T.; OHGUCHI, K.; TANAKA, T.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y. Cytotoxic benzophenone derivatives from *Garcinia* species display a strong apoptosis-inducing effect against human leukemia cell lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, p.569-571, 2003.