

Caracterização de Inibidores Sobre a Atividade da Pró-proteína Convertase Furina

**Gerson Profeta de Souza¹; Jéssica Aparecida da Silva Pereira¹
Wagner Alves de Souza Judice¹;**

¹Universidade 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. Os ensaios de inibição da pró-proteína convertase Furina utilizando-se os compostos benzofenonas gerou valores de IC_{50} que variaram entre 0,6-10,8 μ M e para os compostos biflavonóides os valores de IC_{50} variaram entre 2,79-16,8 μ M. Realizou-se a determinação do mecanismo de inibição da Furina pelos compostos VG0 (biflavonóide) e LFQM-119 (benzofenona) sendo que ambos apresentaram mecanismo de inibição competitivo, cujos valores de constante de inibição foram, $K_i=14\mu$ M para LFQM-119 e $K_i=2,4\mu$ M para o biflavonoide VG0.

Palavras-chave: Furina, 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.

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. Dentre essas convertases a primeira a ter sua estrutura tridimensional definida foi a Furina ⁽¹⁾. 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 ⁽²⁾.

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^(3,4,5). 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. 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⁽⁶⁾. 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.

Dessa forma, tais compostos apresentam potencial uso em drogas anti-proteolíticas no tratamento de doenças nas quais proteases estejam envolvidas, como tumores crônicos⁽⁷⁾. 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⁽⁸⁾. 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

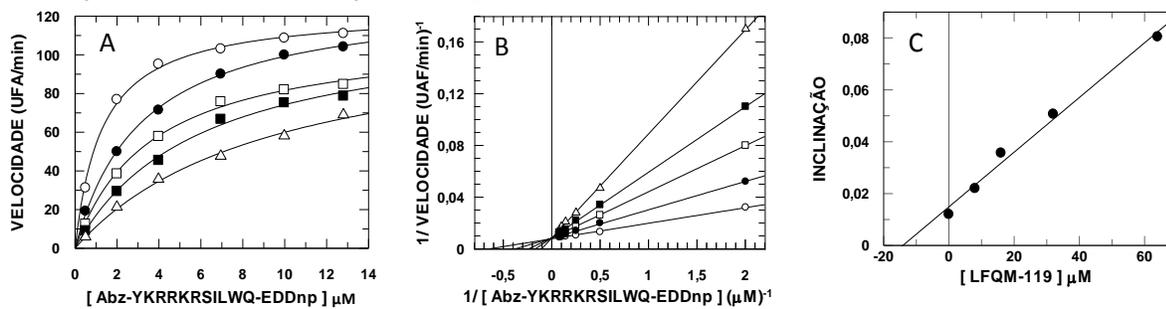
Os ensaios de inibição da protease Furina foram realizados em tampão 10mM MES, 1mM CaCl²⁺, 0,01% Triton, 5mM MgCl₂, pH 6,5. A percepção das hidrólises foi possível devido à medição da fluorescência utilizando-se o substrato Abz-YFRRKRSILWQ-EDDnp, como sondas fluorescentes onde ABZ (ácido orto-aminobenzóico) 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 IC₅₀ 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 IC₅₀, 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



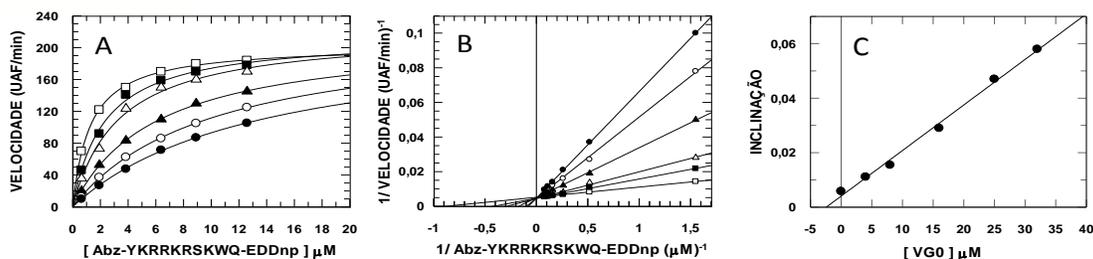
Nossos resultados mostraram que os valores de IC_{50} para as benzofenonas variaram entre 0,6-10,8 μ M e entre 2,79-16,8 μ M para biflavonóides. Os compostos VG0 e LFQM-119 foram os mais potentes na inibição da pró-proteína convertase Furina com valores de IC_{50} de XXX e YYY, respectivamente. Para estes compostos foi determinado o mecanismo de inibição e 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 $1/V_{max}$ com valor de $K_i = 14 \pm 3 \mu$ M com $\alpha \rightarrow \infty$. 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-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

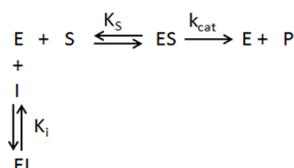


Experimentos realizados mostraram supressão da fluorescência do grupo fluorescente Abz (ácido orto-aminobenzóico) frente ao composto biflavonóide VG0. Não se verificou efeito da supressão deste grupo fluorescente pelos compostos da classe da benzofenona. Os dados coletados foram utilizados para efetuarem-se 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 $K_i = 2,4 \pm 0,3 \mu$ 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-Mentem para a determinação do K_i e mecanismo de inibição da enzima de processamento Furina pelo composto VG0. **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 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 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 como bacilo do Antrax.

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. **J. Cell. Biol.**, 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. **Front. Neuroendocrinol.** v.16, p.322-361, 1995.
- (5) SEIDAH, N.G., CHRÉTIEN, M., DAY, R. **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. **Biol Pharm Bull**, v.26, p.569-571, 2003.