

### Sistemas modelos biomiméticos de haloperoxidasas e inhibidores de fosfatasa ácida y alcalina.

Juliana E. Parente, Khalil Jori, Luciana G. Naso, Patricia A.M. Williams, Evelina G. Ferrer

Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR, CONICET, UNLP)-Departamento de Química- Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Boulevard 120 entre 60 y 64, C.C.962-(B1900AVV) -1900 La Plata, Argentina. e-mail: julianaeparente@yahoo.com.ar

#### **Introducción y objetivo**

El vanadio es un elemento microtraza presente en plantas y en organismos vivos (incluidos los seres humanos) y su participación en diversos procesos biológicos se encuentra a la fecha bien documentada. El potencial farmacológico de los compuestos del vanadio como metalodroga ha sido probado y sus usos farmacológicos se vinculan con una variedad de patologías. Una variedad de compuestos de vanadio se han estudiado como modelos funcionales para haloperoxidasas dependientes de vanadio (VHPOs) con la finalidad no sólo de obtener una mejor comprensión del mecanismo de acción de las mismas y determinar el rol de vanadio presente en su sitio activo, sino a partir del interés industrial y farmacológico que presentan [1]. Este tipo de enzimas catalizan la halogenación de sustratos orgánicos con ayuda de peróxido de hidrógeno, así por ejemplo las bromoperoxidasas (*Corallina officinalis* and *Corallina pilulifera*) contienen vanadio (V) en su sitio activo.

Por otra parte, la fosfatasa cataliza la eliminación de grupos fosfato de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas, alcaloides y otros sustratos. Existen dos formas de la misma, la ácida y la alcalina presentes en vegetales, levaduras y en diferentes órganos y tejidos del ser humano. Ambas catalizan la misma reacción, pero a pHs diferentes. Estas enzimas juegan un rol importante en la transducción de señales, la regulación de procesos celulares manteniendo, junto con las quinasas, los niveles de fosforilación de las células. Un mal funcionamiento de la actividad de las fosfatasas está asociado a diferentes patologías, por tal motivo los inhibidores de fosfatasas son drogas prometedoras desde el punto de vista terapéutico [2].

Por lo expuesto, el objetivo de esta investigación se centra en el estudio de las potencialidades de los complejos de coordinación con vanadio como simuladores de la actividad desarrollada por las enzimas peroxidasa e inhibidores de la actividad de las fosfatasas.

#### **Materiales y Métodos**

Los complejos de coordinación entre el ácido 4-aminobenzoico (4-amino) y las especies químicas de vanadio(IV) y (V) cuyas actividades biomiméticas e inhibitorias se presentan en esta comunicación, fueron previamente preparados y caracterizados fisicoquímicamente en el grupo de trabajo donde los estudios realizados sobre los mismos dan lugar a las siguientes formulaciones: (i)  $[\text{VO}(\text{O}_2)\text{LH}_2\text{O}] \cdot \text{H}_2\text{O}$  y (ii)  $[\text{VOL}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$  donde L=4-amino benzoato. Los mismos fueron preparados y purificados para su ensayo en este trabajo y se determinó además que los mismos son estables en los solventes utilizados mediante espectrofotometría UV-visible durante el tiempo de manipulación de los mismos considerándose aptos para los ensayos a realizar.

Las técnicas utilizadas se describen a continuación:

(A) Determinación *in vitro* de actividad catalítica bromoperoxidasa: La reacción consiste en la bromación de rojo fenol a pH=5.8 como sustrato orgánico. La mezcla de reacción contiene buffer fosfato (50 ml, pH=5,8), KBr (2M), rojo fenol (2,5 - 20  $\mu\text{M}$ ) y el catalizador ( $2,4 \times 10^{-5}$  M). La reacción se sigue con la aparición de la banda a 592 nm característica del producto resultante de la bromación. Con la información obtenida se procedió al análisis de la cinética de la reacción de catálisis la cual en

general presenta una dependencia de primer orden de donde se procedió al cálculo de la constante de seudo primer orden (Gráfico tipo Lineweaver-Burk) [3].

(B) Determinación *in vitro* de la capacidad de inhibición de fosfatasa: Se realizó por UV-vis con la determinación de la formación de 4-nitrofenolato (405 nm). Para la fosfatasa ácida (AcP) la mezcla de reacción contiene: 1,0 ml de buffer (acetato, pH=5,6), 100-500  $\mu$ l de solución de complejo; se incuba a 37°C durante 10 min. Inicio: adición de 100  $\mu$ l del sustrato (paranitrofenil fosfato (PNPP), 20 min). Fin: adición de 0,5 ml de NaOH (0,5 M). Para la fosfatasa alcalina (ALP), la mezcla de reacción contiene: 100  $\mu$ L de solución sustrato (PNPP) a 880  $\mu$ L de solución buffer glicina pH=10,5. Ésta solución se incuba diez minutos en un baño a 37°C, previamente termostatzado, y luego se le agrega 100-500  $\mu$ l de solución de complejo. La reacción no se detiene, se miden todas las muestras a igual tiempo [4].

## Resultados

Los ensayos de inhibición de las fosfatasa mostraron que el complejo de vanadio (IV) resulta mejor inhibidor para AcP y el de vanadio (V) para ALP (Figura 1).

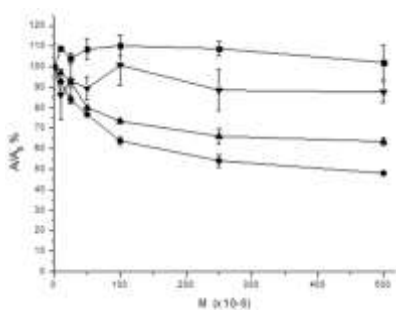
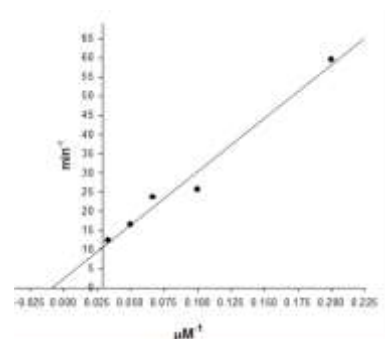


Figura 1. Gráfico de inhibición de la actividad de ALP para ácido 4-aminobenzoico(▼), VOSO<sub>4</sub>(▲), [VO(O<sub>2</sub>)LH<sub>2</sub>O]•H<sub>2</sub>O(●) y [VOL<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O] (■)

Para ALP, [VOL<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O] no muestra efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática. En cambio, el complejo de vanadio(V), [VO(O<sub>2</sub>)LH<sub>2</sub>O]•H<sub>2</sub>O presenta una inhibición mayor que la que muestra el VOSO<sub>4</sub>, llegando a una inhibición del 50% cuando se utiliza una concentración de 500  $\mu$ M. Para AcP, tanto el 4-amino como [VO(O<sub>2</sub>)LH<sub>2</sub>O]•H<sub>2</sub>O no producen inhibición, mientras que [VOL<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O] produce una inhibición de la actividad enzimática, con menor eficiencia que la inhibición generada por el sulfato de vanadilo, llegando a generar una inhibición del 50% de la actividad enzimática a una concentración de 500  $\mu$ M (CI<sub>50</sub>).

A partir de las medidas de absorbancia vs tiempo de la reacción de bromación de rojo fenol, para ambos complejos, hemos podido obtener la curva de saturación de la reacción enzimática, la cual muestra la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de reacción, permitiéndonos determinar, para cada complejo, la correspondiente constante de Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>), la cual corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la V<sub>max</sub>. En la Figura 2 se muestra la gráfica correspondiente al complejo de vanadio(IV) para el cual se obtuvo una K<sub>M</sub> de 111,3  $\mu$ M y una V<sub>max</sub>=0,4  $\mu$ M x min<sup>-1</sup>



## Conclusiones

Los aminoderivados muestran especificidad sobre las fosfatasa. El de vanadio(IV) resulta mejor inhibidor de la fosfatasa ácida y el de vanadio(V) de la alcalina. Puede pensarse que el pH óptimo de funcionamiento de las enzimas esté relacionado a éstas diferencias en la actividad, se sabe que el vanadio(IV) es más estable en los rangos de pH ácido que alcalino cosa que no ocurre para vanadio(V).

Ambos complejos demostraron poseer actividad bromoperoxidasa siendo capaces de actuar sobre el rojo fenol.

## Referencias

- [1] Vanadium bromoperoxidase and functional mimics, Alison Butler, Anne H. Baldwin in Metal Sites in Proteins and Models Structure and Bonding Volume 89, 1997, pp 109-132 2005.
- [2] A. Y. Louie and T. J. Meade, Chem. Rev. 1999, 99, 2711-2734.

[3] D. Wischang, O. Brücher, J. Hartung, *Coord. Chem. Rev.* 255 (2011) 2204– 2217.

[4] N. Martini, J.E. Parente, M.E. Toledo, G.E. Escudero, C.H. Laino, J.J. Martínez Medina, G.A. Echeverría, O.E. Piro, L. Lezama, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. *J. Inorg. Biochem.* DOI: doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.05.012.



# EXPOFYBI

EXPOSICIÓN Y CONGRESO INTERNACIONAL  
DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA INDUSTRIAL

8.9.10.11  
AGOSTO  
2017



IV Congreso Latinoamericano de Farmacia y Bioquímica Industrial



XIII Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial - JorFyBI 2017



XV Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial



Workshops

**Certificamos que**

Juliana E. Parente, Khalil Jori, Luciana G. Naso, Patricia A.M. Williams y Evelina G. Ferrer

**ha participado en las XIII Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial | JorFyBI 2017 como coautor del trabajo** SISTEMAS MODELOS BIOMIMÉTICOS DE HALOPEROXIDASAS E INHIBIDORES DE FOSFATASA ÁCIDA Y ALCALINA

Buenos Aires, 8 . 9 . 10 . 11 de agosto de 2017.

  
Alicia Gentile.  
Presidente JorFyBI

 **SAFYBI**  
ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FARMACIA  
Y BIOQUÍMICA INDUSTRIAL

  
Marcelo Ricci  
Presidente Comité Científico