

INIBIÇÃO DA KLK6 PELO DOMÍNIO KPI

César Augusto Ribeiro⁽¹⁾; Pedro Francisco Ângelo Júnior⁽²⁾

⁽¹⁾ Estudante; Curso de farmácia generalista; Centro Universitário de Itajubá – FEPI; cesarribeiro85@hotmail.com; ⁽²⁾ Pesquisador; Universidade de São Paulo; anghellus@yahoo.com;

RESUMO

Mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que afeta pessoas com mais de 65 anos de idade e para qual não há tratamento efetivo atualmente. Estudos têm demonstrado que a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, pode induzir a produção de peptídeos beta amiloides e de uma isoforma da APP denominada APP-KPI, que contém em sua estrutura um domínio inibidor de serino proteases denominado “Kunitz Protease Inhibitor” (KPI). Serino proteases são enzimas proteolíticas envolvidas em vários processos fisiopatológicos. Uma nova serino protease, denominada KLK6, tem sido associada à progressão desta doença. O nível desta enzima aumenta no plasma e diminui no cérebro de pacientes com mal de Alzheimer. Trabalhos sugerem que a KLK6 exerça um papel protetor do SNC. Para elucidar o papel desta enzima em mal de Alzheimer este trabalho se propõe a fazer um estudo de inibição enzimática pelo domínio KPI, sugerindo que, em condições fisiológicas, o domínio KPI poderia inibir a atividade protetora da KLK6, aumentando a susceptibilidade para o mal de Alzheimer.

Palavras-chave: Inibição. Domínio KPI. Calicreína 6

INTRODUÇÃO

O Mal de Alzheimer constitui uma forma de demência progressiva e para o qual não há cura, podendo eventualmente, levar a morte. A doença foi descrita pela primeira vez em 1906 pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer in 1906 (Berchtold, N. C., Cotman, C. W., 1998). Em 2006, havia 26.6 milhões de pessoas ao redor do mundo com mal de Alzheimer. Estudos tem demonstrado que até o ano 2050, a doença afetará 1 em cada 85 habitantes (Brookmeyer, R. *et al*, 2007).

A doença pode ser causada por mutações que promovem a produção de um peptídeo denominado beta amiloide ($A_{\beta}42$), que é o principal componente das placas senis (Selkoe, 1999).

A memantina é um antagonista não competitivo dos receptores de NMDA. O fármaco age bloqueando os receptores de NMDA e inibindo sua superestimulação pelo glutamato. Trabalhos têm sugerido que a chave para uma maior compreensão da doença está na ligação da proteína APP com os receptores de NMDA através do aumento da expressão de uma isoforma da APP contendo um domínio KPI adicional e, por esta razão, denominada APP-KPI (Sylvain Lesné, *et al.*, 2005).

Atualmente, trabalhos têm sugerido que a chave para uma maior compreensão da doença está na ligação da proteína APP com os receptores de NMDA através do aumento da expressão de uma isoforma da APP contendo um domínio KPI adicional e, por esta razão, denominada APP-KPI (Sylvain Lesné, *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho é demonstrar que o domínio KPI pode inibir a ação da KLK6 e assim predispor a pessoa a desenvolver mal de Alzheimer.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio de Cinética Enzimática serão utilizados para se determinar a eficiência da atividade catalítica das proteases. Neste ensaio será utilizado o peptídeo FRET Abz-KLRSSKQ-Eddnp, onde cada letra corresponde a um aminoácido na sequência polipeptídica.

Neste ensaio, concentrações do peptídeo variando de 100nM – 100uM serão incubadas a 37°C por 1 minuto com a KLK6. Após este período, será realizada uma leitura espectrofotométrica da incubação. Os valores serão plotados num gráfico e ajustados para a equação de Michaelis-Mentem. Experimento idêntico será realizado com KLK1 e tripsina como bases de comparação.

Para se realizar os ensaios de inibição, as enzimas (tripsina, KLK1 e KLK6), isoladamente, serão incubadas por 30 minutos com o peptídeo derivado do domínio KPI em concentrações que variam de 1nM – 10uM. Após o período de incubação, proceder-se-á uma incubação nos mesmos moldes do item anterior. De posse

destes dados, os pesquisadores prepararão os gráficos de Lineweaver-Buker para determinar o tipo de inibição e o K_i do domínio KPI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa atualmente encontra – se em desenvolvimento bibliográfico que consolide os aspectos teóricos para desenvolvimento da prática, a fim de se obter resultados precisos. Conforme a literatura científica empregada até o presente momento da pesquisa, o domínio KPI presente em algumas proteínas denominadas APP, exerce uma ação inibitória sobre a KLK6, que possivelmente desenvolve um papel neuroprotetor, por apresentar sua concentração reduzida no cérebro em pacientes portadores do Mal de Alzheimer (Diamandis, *et al.*, 2006.). Para que os resultados acima descritos possam ser elucidados, busca – se uma estrutura laboratorial que proporcione realização satisfatória dos testes necessários para cumprimento da pesquisa, tornando – se este um desafio deste projeto.

CONCLUSÃO

É esperado que o domínio KPI iniba a ação da KLK1, KLK6 e tripsina, estabelecendo – se, assim, uma relação bioquímica na atividade de serino proteases como a KLK6 e o desenvolvimento do Mal de Alzheimer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERCHTOLD, N. C., COTMAN, C. W. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s. ***Neurobiol. Aging***. v. 19, n.3, p.173–89,1998.

BROOKMEYER, R., *et al.* Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. ***Alzheimer's and Dementia***.,**Retrieved** v.3, n.3, p.186–91, 2007.

DIAMANDIS, *et al.* "Proceedings of the 1st International Symposium on Kallikreins, Lausanne, Switzerland, September 1-3, 2005". ***Biol Chem*** v.387 n.6): p.635-824, 2006.

Selkoe, D. J., Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. **Nature**. 1999; 399(6738 Suppl):A23–31.

Sylvain Lesné, *et al.* NMDA Receptor Activation Inhibits α -Secretase and Promotes Neuronal Amyloid- β Production. **The Journal of Neuroscience**, October v.25, n.41,p. 9367-9377, 2005.