

# ESTUDO CINÉTICO DA MONOAMINA OXIDASE MITOCONDRIAL HEPÁTICA EM PRESENÇA DE COMPOSTOS COM DIFERENTE CARÁCTER POLAR

M. CRAVINO, A. PONCES FREIRE, M. AZEVEDO, C. MANSO

Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina de Lisboa.

## RESUMO

Fizeram-se estudos cinéticos da actividade da monoamina oxidase utilizando um substrato com características hidrófilas em presença de inibidores com carácter polar variável. Verificou-se que a Nialamida e o Propranolol, compostos com carácter hidrófobo acentuado, apresentam um mecanismo de inibição misto não competitivo. Pelo contrário, a Fenformina e a Metformina, ambas polares, interferem directamente com o centro de ligação ao substrato apresentando um mecanismo competitivo puro. Os resultados obtidos estão de acordo com a hipótese de que o enzima seja uma proteína integral da membrana mitocondrial externa, dependendo a sua actividade da camada de fosfolípidos que envolve os diferentes centros de ligação da molécula.

## SUMMARY

**Kinetic studies on liver mitochondrial MAO in presence of substrates with different polar characteristics**

Kinetic studies of MAO were made, using hydrophobic and hydrophylic substrates. Nialamid and propranolol, both hydrophobic, show a mechanism of inhibition of the mixed non competitive type. Phenformin and metformin, both hydrophylic, interfere directly with the active center, showing a purely competitive mechanism of inhibition. The results are in accordance with the hypothesis that the enzyme is an integral part of the external mitochondrial membrane, depending its activity on the phospholipids which surround the active centers.

## INTRODUÇÃO

A monoamina oxidase [amina-oxigénio oxireductase (de-saminase) (com flavina), E. C. 1.4.3.4], enzima localizado na membrana mitocondrial externa<sup>1</sup> catalisa reacções de de-saminação oxidativa de aminas.

Johnson, em 1968, classifica-o em dois tipos, A e B, tendo em conta fundamentalmente a sensibilidade variável face a diferentes inibidores.<sup>2</sup> No entanto, este conceito tem sido posto em causa, já que muitas diferenças funcionais descritas entre MAO-A e B parecem depender apenas do conteúdo lipídico e integridade da membrana na qual o enzima se insere.<sup>3</sup>

Segundo Dennick e col<sup>4</sup> parece não ser possível distinguir imunologicamente diferentes formas enzimáticas.

Assim, tem sido sugerido em alternativa um conceito de enzima como uma entidade molecular única, oligómera, com vários centros de ligação distribuídos ao longo da molécula. As diferenças de comportamento dos vários centros seriam explicadas pelo ambiente lipídico variável em redor da molécula.<sup>5</sup>

Pretende-se com este trabalho investigar do ponto de vista cinético as características alotópicas da monoamina oxidase *in situ*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os mitocôndrios foram preparados por método referido anteriormente<sup>6</sup> a partir de fígados de ratos Sprague-Dowley de três meses de idade mortos por exsanguinação. Foram conservados em tampão fosfato numa concentração de proteína de 5 mg/ml à temperatura de -20 °C até posterior utilização.

As proteínas foram determinadas pelo método de Layne.<sup>7</sup>

O substrato benzilamina HCl foi obtido da Sigma Chemical C.º. A Nialamida foi obtida dos Laboratórios Pfizer, o Propranolol HCl da Sigma Chemical C.º e a Metformina e a Fenformina foram gentilmente oferecidas pela Boehringer Mannheim (Portugal).

A actividade da monoamina oxidase foi determinada a 37 °C, utilizando tampão fosfato 10 mM, pH 7.2, numa adaptação da técnica de Tabor e col<sup>8</sup> e McEwen e col,<sup>9</sup> anteriormente descrita.<sup>10</sup>

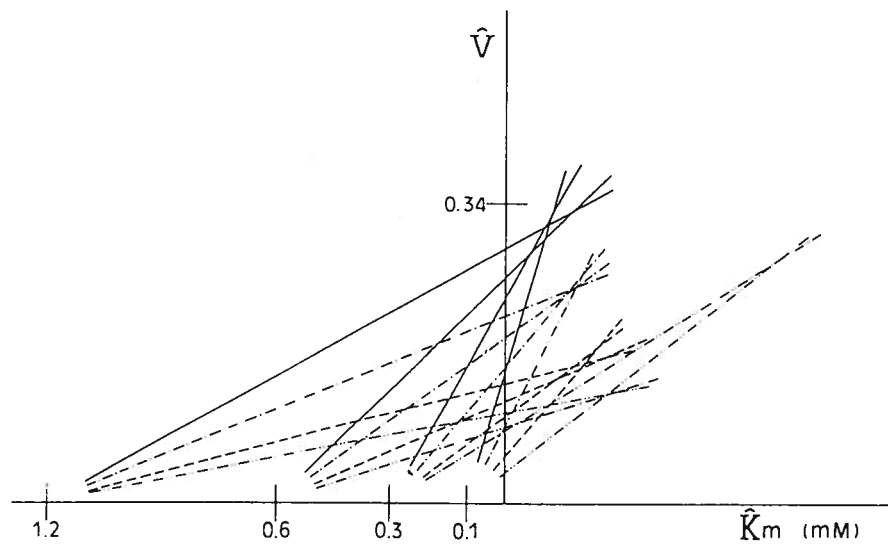
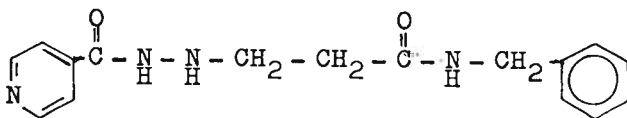


Figura 1 a): Determinação dos parâmetros cinéticos para o sistema benzilamina-Nialamida pelo método de Eisenthal  
 I = 0 —————; I = 5 - - - - -; I = 10 .....; I = 15  $\mu$ M - · - · - ·

**RESULTADOS**

— Experiências com Nialamida



Nialamida (N-Isonicotinoil-N'[\beta-(N-benzilcarboxamida) etil] hidrazina)

Fizeram-se experiências utilizando Nialamida em concentrações variando de 5 a 15  $\mu$ M com concentrações de substrato de 0.1 a 1.2 mM, que conduziram a valores variáveis quer da constante de Michaelis quer da velocidade máxima (Quadro 1).

**QUADRO 1** Acção da Nialamida sobre os parâmetros cinéticos da MAO

		Nialamida ( $\mu$ M)			
		0	5	10	15
PARÂMETROS CINÉTICOS	$K_m^{ap}$ (mM)	0.12	0.17	0.20	0.28
	$V^{ap}$ $\mu$ mol benzaldeído formado / min / mg proteína	0.32	0.24	0.16	0.13

Quer o método de Eisenthal<sup>11</sup> quer o de Lineweaver-Burk<sup>12</sup> mostram o efeito inibidor da nialamida sobre a acção da monoamina oxidase na desaminação oxidativa da benzilamina (Figura 1a) e 1b)).

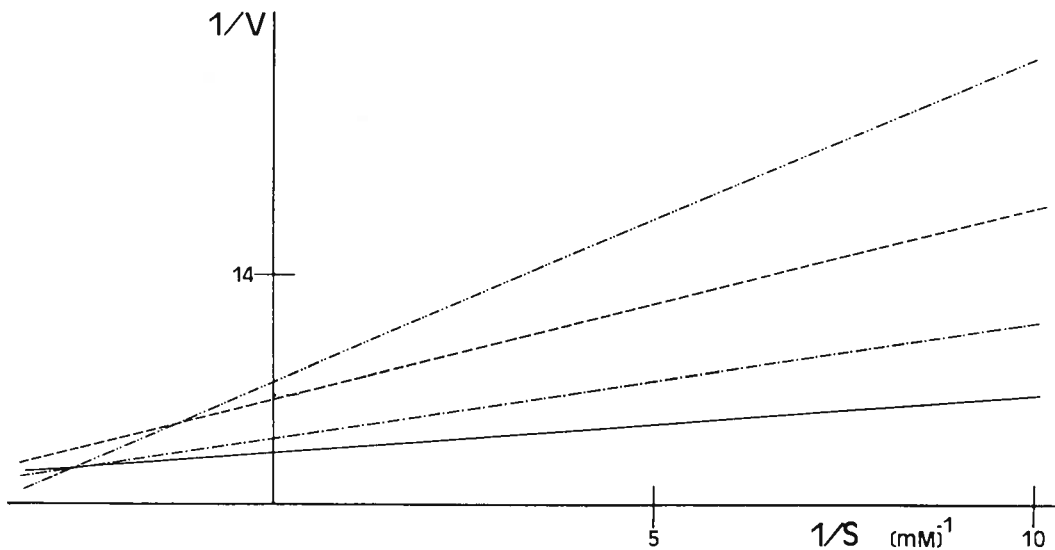
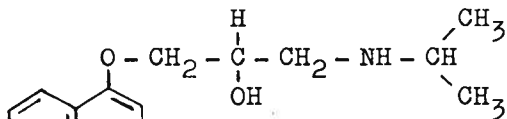


Figura 1 b): Gráfico de Lineweaver-Burk para o sistema benzilamina-Nialamida  
 I = 0 —————; I = 5 - - - - -; I = 10 .....; I = 15  $\mu$ M - · - · - ·

As constantes de dissociação dos complexos com inibidor foram calculadas utilizando os gráficos secundários<sup>13</sup> e apresentam os seguintes valores  $K_i = 1.3 \mu\text{M}$  e  $K_{ii} = 5.0 \mu\text{M}$ .

— Experiências com Propranolol



Propranolol (1-[isopropilamino]-3-[1-naftiloxi]-2-propanol)

Utilizou-se Propranolol como inibidor em concentrações de 1 a 2 mM, obtendo-se os resultados que constam no Quadro 2.

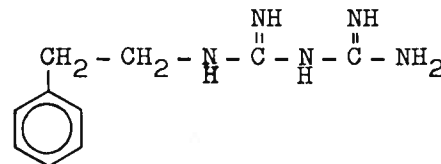
QUADRO 2 Ação do Propranolol sobre os parâmetros cinéticos da MAO

		Propranolol (mM)			
		0	1	1.5	2.0
PARÂMETROS CINÉTICOS	$K_m^{ap}$ (mM)	0.22	0.22	0.24	0.28
	$V^{ap}$ $\mu\text{mol}$ benzaldeído formado / min / mg proteína	0.40	0.33	0.29	0.28

Como se pode observar pelas Figuras 2a) e b) verifica-se ainda uma variação de ambos os parâmetros cinéticos.

Os valores de  $K_i$  e  $K_{ii}$  calculados para este sistema são respectivamente 1.41 e 6.96 mM.

— Experiências com Fenformina e Metformina



Fenformina (N-(2-feniletil) imidodicarbonimidica diamida)

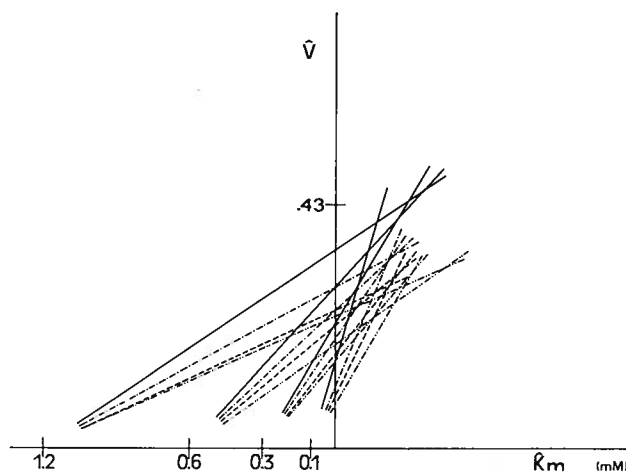
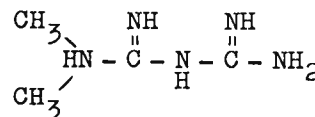


Figura 2 a): Determinação dos parâmetros cinéticos para o sistema benzilamina-Propranolol pelo método de Eisenthal  
I = 0 ———; I = 1.0 - - - -; I = 1.5 .....; I = 2.0 mM - · - · -



Metformina (N, N-dimetilimidodicarbonimidica diamida)

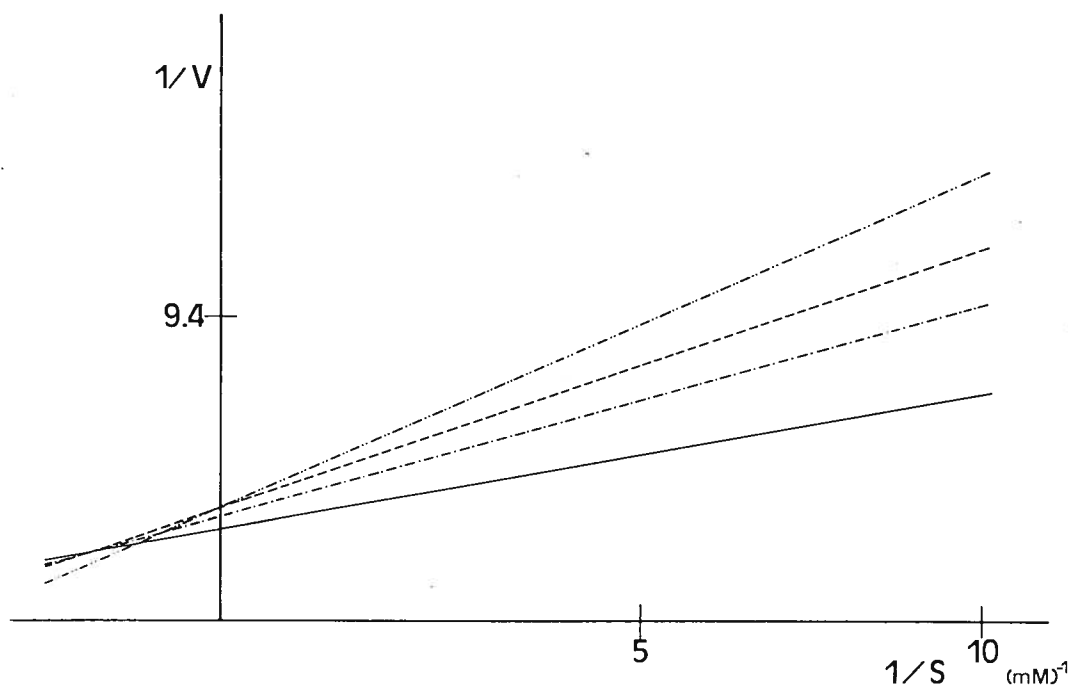


Figura 2 b): Gráfico de Lineweaver-Burk para o sistema benzilamina-Propranolol  
I = 0 ———; I = 1.0 - - - -; I = 1.5 .....; I = 2.0 mM - · - · -

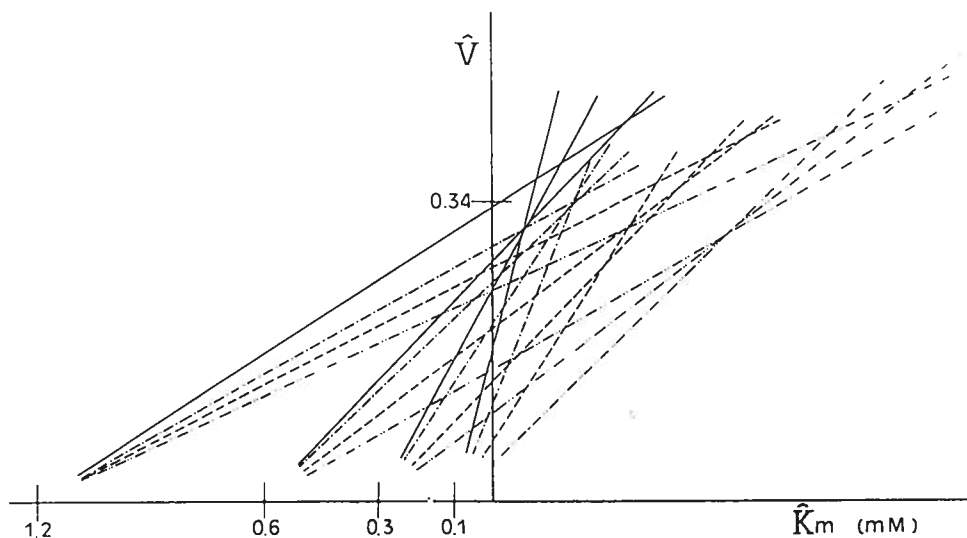


Figura 3 a): Determinação dos parâmetros cinéticos para o sistema benzilamina-Fenformina pelo método de Eishenthal  
 $I=0$  ———;  $I=1$  - - - - -;  $I=5$  .....;  $I=10$  mM - - - - -

Utilizando como inibidor quer a Fenformina (1-10mM) que a Metformina (4-20mM) verifica-se que o valor da velocidade máxima permanece praticamente constante, enquanto que a constante de Michaelis aumenta com a concentração de inibidor (Quadro 3 e 4)

QUADRO 3 Acção da Fenformina sobre os parâmetros cinéticos da MAO

		Fenformina (mM)			
		0	1	5	10
PARÂMETROS CINÉTICOS	$K_m^{ap}$ (mM)	0.11	0.21	0.46	0.75
	$V^{ap}$ $\mu$ mol benzaldeído formado / min / mg proteína	0.34	0.36	0.36	0.34

QUADRO 4 Acção da Metformina sobre os parâmetros cinéticos da MAO

		Metformina (mM)			
		0	4	10	20
PARÂMETROS CINÉTICOS	$K_m^{ap}$ (mM)	0.20	0.28	0.34	0.46
	$V^{ap}$ $\mu$ mol benzaldeído formado / min / mg proteína	0.55	0.54	0.56	0.53

Os valores da constante de dissociação do complexo EI são para a Fenformina de 1.9 mM e para a Metformina de 16.6 mM (Quadro 5).

QUADRO 5 Constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor para os compostos estudados

	Inibidores			
	Nialamida ( $\mu$ M)	Propranolol (mM)	Fenformina (mM)	Metformina (mM)
$K_i$	1.3	1.4	1.9	16.6
$K_{ii}$	5.0	7.0	1.9	16.6

## DISCUSSÃO

Verifica-se que os resultados obtidos para o mecanismo de inibição da monoamina oxidase pelas biguanidas, Nialamida e Propranolol, compostos com carácter polar variável, estão de acordo com a hipótese de que a actividade enzimática dependerá, entre outros factores, da distribuição assimétrica de fosfolípidos ao longo da membrana e da integridade da mesma.<sup>14-16</sup>

Assim, compostos com carácter polar elevado, como as biguanidas, face a um substrato tipo B apresentam claramente um mecanismo de inibição do tipo competitivo puro interferindo, portanto, directamente com a ligação a centros da proteína situados no exterior da membrana mitocondrial externa.

Pelo contrário, compostos com certo carácter hidrófobo como a Nialamida e o Propranolol, apresentam um mecanismo de inibição não competitivo misto, o que se poderá

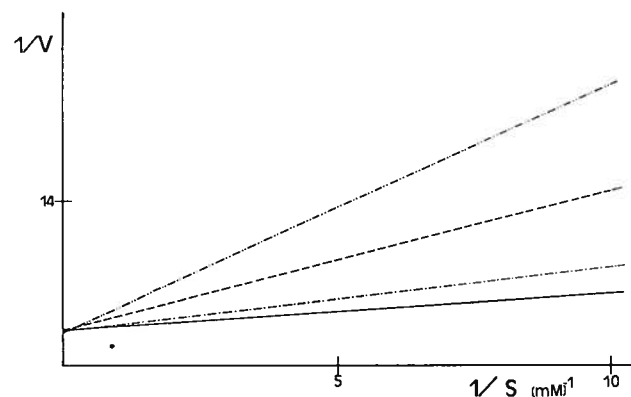


Figura 3 b): Gráfico de Lineweaver-Burk para o sistema benzilamina-Fenformina  
 $I=0$  ———;  $I=1$  - - - - -;  $I=5$  .....;  $I=10$  mM - - - - -

explicar com base em interações desses ligandos com centros de ligação situados em zonas da molécula de proteína no interior da membrana, envolvido, portanto, por camadas lipídicas.

De notar, que o carácter inibidor da Fenformina é cerca de nove vezes superior ao da Metformina, o que poderá ter como consequência uma maior toxicidade da primeira.

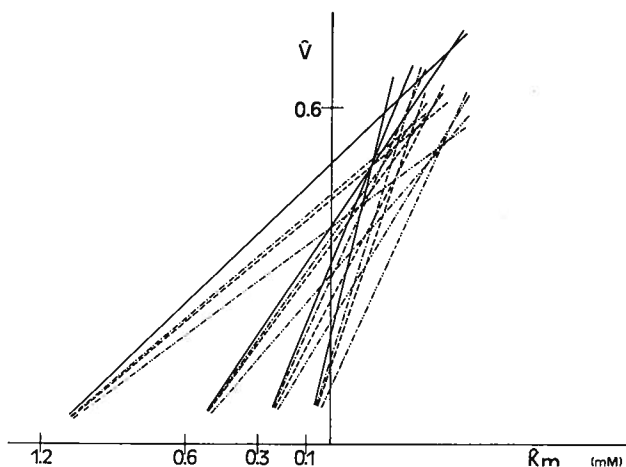


Figura 4 a): Determinação dos parâmetros cinéticos para o sistema benzilamina-Metformina pelo método de Eisenthal  
 $I = 0$  ———;  $I = 4$  - - - - -;  $I = 10$  ·····;  $I = 20$  mM - ·····

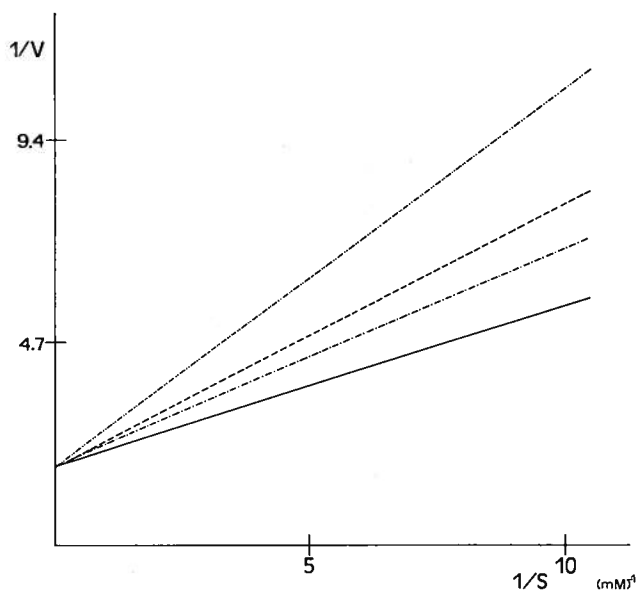


Figura 4 b): Gráfico de Lineweaver-Burk para o sistema benzilamina-Metformina  
 $I = 0$  ———;  $I = 4$  - - - - -;  $I = 10$  ·····;  $I = 20$  mM - ·····

Verifica-se ainda que, de entre os inibidores estudados, a hidrazina é de longe a que apresenta maior poder inibidor, com valores de  $K_i$   $10^3$  superiores aos do bloqueante  $\beta$ -adrenérgico estudado (Quadro 5).

Os mecanismos cinéticos descritos poderão ainda explicar alguns resultados experimentais já publicados. Assim, uma diminuição da actividade total do enzima com variação da razão A/B em ratos submetidos a dieta deficiente em lípidos,<sup>17</sup> é perfeitamente compreensível já que a carência destes corresponderá a um processo de regulação em que os centros do tipo A deixam de estar funcionais. Haverá, portanto, aumento relativo da actividade dos centros de ligação sensíveis a ligandos com carácter hidrófilo (tipo B). Refira-se ainda que ratos geneticamente obesos terão um aumento da razão A/B.<sup>18</sup>

Ressalta, portanto, a necessidade de estudar o mecanismo regulador de diferentes efectores, em particular fosfolípidos sobre o enzima purificado.

## BIBLIOGRAFIA

1. TRIPTON, K.F.: The Sub-Mitochondrial Localization of Monoamine Oxidase in Rat Liver and Brain. *Biochem. Biophys. Acta* 1967; 135: 910-920.
2. JOHNSTON, J.P.: Some Observations Upon a New Inhibitor of Monoamine Oxidase in Brain Tissue. *Biochem. Pharm.* 1968; 17: 1285-1297.
3. JAIN, M.: Monoamine Oxidase: Examination of Multiple Forms. *Life Sci.* 1977; 20: 1925-1934.
4. DENNICK, R.G. & MAYER, R.J.: Purification and Immunochemical Characterization of Monoamine Oxidase from Rat and Human Liver. *Biochem. J.* 1977; 161: 167-174.
5. SCHURR, A.; HO, B.T. & SCHOOLAR, J.C.: Human Brain Monoamine Oxidase: One Molecular Entity-Multiple binding sites? *J. Pharmacol.* 1981; 33: 165-170.
6. KINEMUCHI, H.; ARAI, Y.; ORELAND, Y.; TRIPTON, K.T. & FOWLER, C.P.: Time-Dependent Inhibition of Monoamine Oxidase by B-Phenethylamine. *Biochem. Pharm.* 1982; 31: 959-964.
7. LAYNE, E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O; eds.), vol 3, p. 447-457, Academic Press, New York. 1957.
8. TABOR, C.; TABOR, H. & TABOR, S.: Purification of Amine Oxidase from Beef Plasma. *J. Biol. Chem.* 1954; 208: 645-661.
9. MCEWEN, JR. C. & COHEN, J.: An Amine Oxidase in Normal Human Serum. *J. Lab. Clin. Med.* 1963; 72: 766-776.
10. CRAVINO, M.; PONCES FREIRE, A. & AZEVEDO, M.: Mecanismo de Inibição da Monoamina Oxidase Mitochondrial Hepática por Nialamida e Fenformina. *Rev. Port. Bioq. Apl.* 1983; 6: 3-8.
11. EISENTHAL, R. & CORNISH-BOWDEN, A.: The Direct Linear Plot. A New Graphical Procedure for Estimating Enzyme Kinetic Parameters. *Biochem. J.* 1974; 139: 715-720.
12. LINEWEAVER, H. & BURK, D.: The Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 1974; 56: 658-666.
13. FREIRE, A.: In: *Estudo cinético do Mecanismo de Inibição da Tripsina e Quimotripsina por  $\alpha$ -antitripsina e Inibidor Purificado de Soja*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências de Lisboa, Lisboa 1981.
14. HOUSLAY, M.D. & TRIPTON, K.F.: The Nature of the Electrophoretically separable Multiple Forms of Rat liver Monoamine Oxidase. *Biochem. J.* 1973; 135: 173-186.
15. EKSTEDT, B. & ORELAND, L.: Effect of Lipid-Depletion in the Different forms of Monoamine Oxidase in Rat Liver Mitochondria. *Biochem. Pharm.* 1976; 25: 119-124.
16. EKSTEDT, B. & ORELAND, L.: Heterogeneity of Pig Liver and Pig Brain Mitochondrial Monoamine Oxidase. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1976; 222: 157-165.
17. KANDASWAMI, C. & D'IORIO, A.: On Hepatic Mitochondrial Monoamine Oxidase activity in Lipid Deficiency. *Can. J. Biochem.* 1979; 57: 588-594.
18. TONG, J.H.; D'IORIO, A. & KANDASWAMI, C.: On the Characteristics of Mitochondrial Monoamine Oxidase in Pancreas and Adipose Tissues from Genetically Obese Mice. *Can. J. Biochem.* 1979; 57: 197-200.

Pedido de separatas: Carlos Manso  
 Instituto de Química Fisiológica  
 Faculdade de Medicina de Lisboa  
 1600 Lisboa. Portugal.