



## REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



### AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE GLICOSAMINOGLICANOS NA ATIVIDADE DE INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES CATEPSINAS

Ana Laura Ferreira Vicco<sup>1</sup>, Ivarne Luis dos Santos Tersariol<sup>2</sup>, Wagner Alves de Souza Júdice<sup>3</sup>

1. Estudante do Curso de Farmácia da Universidade Mogi das Cruzes; e-mail: [anauravicco@hotmail.com](mailto:anauravicco@hotmail.com);
2. Professor da Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Bioquímica; e-mail: [ivarne.tersariol@gmail.com](mailto:ivarne.tersariol@gmail.com);
3. Professor da Universidade Mogi das Cruzes; e-mail: [wagnerjudice@gmail.com](mailto:wagnerjudice@gmail.com).

**Área do Conhecimento:** Enzimologia

**Palavras-chave:** catepsina B, catepsina L, inibição enzimática, glicosaminoglicanos.

#### INTRODUÇÃO

A catepsina B é encontrada em diversas células em tecidos humanos e no meio extracelular quando liberadas. Atuam na degradação de proteínas e quando sua liberação para o meio extracelular ocorre, estas catepsinas atuam degradando componentes da matriz extracelular. A catepsina B além apresentar atividade como endopeptidase também atua como exopeptidase devido à presença de uma alça de oclusão em sua estrutura. São sintetizadas como zimogênios e os glicosaminoglicanos atuam na modulação da ativação destas, acelerando a ativação destas catepsinas mesmo em pH neutro (DICKINSON, 2002; VERMA, DIXIT, PANDEY, 2016). A catepsina L se encontra presente em diversos organismos como bactérias, vertebrados e em células de mamíferos atuando na degradação de proteínas. Sua pró-região possui três  $\alpha$ -hélices e uma folha  $\beta$  curta e a ativação desta catepsina ocorre através de autoativação, além de contar com a presença dos GAGs que aceleram a ativação mesmo quando em pH neutro (LEÓN *et al.*, 2013; VERMA, DIXIT, PANDEY, 2016). Uma vez que as cisteíno proteases, mais especificamente as catepsinas B e L possuem envolvimento em diversos processos patológicos entre eles o câncer e estando ligadas inclusive à sua progressão, tais enzimas representam um potencial no quesito de estudo e desenvolvimento de fármacos que atuem inibindo-as (ANDRADE *et al.*, 2021; CUNHA, FERNANDES, RAMOS, 2022; DE DIOS HERNANDEZ, 2021).

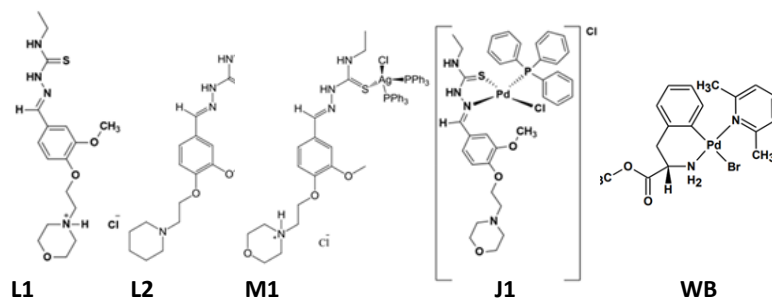
#### OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial inibitório de compostos derivados de vanilina-morfolina-etiltiossemicarbazona e compostos aril-N-heterocíclicos de carbenos Au(I) na ausência e na presença de glicosaminoglicanos sobre a atividade das catepsina B e L.

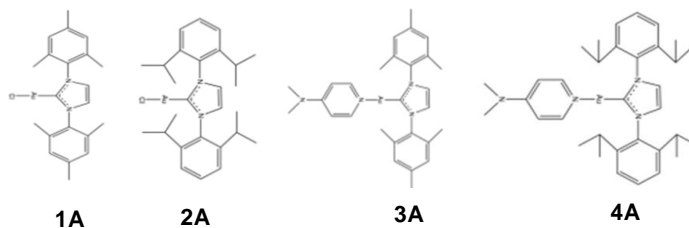
## METODOLOGIA

Os ensaios enzimáticos sobre as catepsinas B (cat-B) e L (cat-L) foram realizados por espectrofluorimetria nos comprimentos de ondas  $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$  = 360/480nm utilizando tampão acetato de sódio 100 mM; EDTA 5 mM, NaCl 100 mM; Triton X-100 0,01 %; 20 % glicerol, pH 5,5 e 3 mM de DTT e substrato Z-FR-MCA a 37°C na ausência de na presença de concentrações crescentes dos compostos. Além disso, os compostos foram testados na ausência e na presença dos glicosaminoglicacos heparina (40 $\mu$ M) e condroitin-4-sulfato (CS4) (5 $\mu$ M) cedidos pelos Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol (UNIFESP-SP) e Prof. Dr. Marcelo Andrade de Lima (Molecular & Structural Biosciences, School of Life Sciences, Keele University, UK). Foram testados 5 compostos sendo que 4 apresentavam o ligante 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona - vanilina tiossemicarbazona (L1, L2, J1, M1) (**figura 1**). Dentre os compostos, dois complexos de paládio (J1 e WB), dois de vanilina-tiossemicarbazona sem ligante metálico (L1 e L2) e um complexo de prata (M1) cedidos pelo Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto do Departamento de Química Geral e Inorgânica da Unesp-Araraquara. Foram também testados quatro compostos aril-N-heterocíclicos de carbenos Au(I) (**figura 2**) cedidos pela Profa. Dra. Camilla Abbehausen do Instituto de Química da Universidade de Campinas (**figura 2**).

**Figura 1** - Estruturas moleculares dos compostos tiossemicarbazonas e paládio



**Figura 2** - Estruturas moleculares dos compostos aril-N-heterocíclicos de carbenos Au(I).



Os dados coletados nos ensaios de inibição foram analisados em programa Grafit® 5.0.13 (Eritacus Software Ltda) e o potencial inibitório ( $IC_{50}$ ) foi determinado por regressão não-linear.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificamos que composto M1, o qual apresenta dois grupos trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) ligada à prata e um grupo piperidina, demonstrou significativa inibição enzimática sobre ambas as catepsinas com  $IC_{50}=2,24\pm 0,04$   $\mu$ M para cat-B e  $IC_{50}=1,81\pm 0,05$   $\mu$ M para cat-L. O composto WB apresentou alto valor de  $IC_{50}$  para a cat-B ( $45,81\pm 2,06$   $\mu$ M) o que pode estar relacionado à presença da alça de oclusão interferindo na ligação do composto e para cat-L ( $IC_{50}=13,24\pm 0,24$   $\mu$ M). Na presença dos GAGs verificamos redução dos  $IC_{50}$ s para ambas as enzimas. Na presença de CS4 o composto WB apresentou  $IC_{50}=5,34\pm 0,10$   $\mu$ M e  $IC_{50}=5,21\pm 0,07$   $\mu$ M para cat-B e cat-L, respectivamente. O composto J1 foi pouco efetivo na inibição de ambas as enzimas na ausência ou presença de heparina. Contudo, na presença de CS4 houve grande efeito inibitório com  $IC_{50}=5,84\pm 0,33$   $\mu$ M para cat-B e  $IC_{50}=1,80\pm 0,01$   $\mu$ M para cat-L. Heparina é capaz de interagir com His<sup>111</sup> localizada na alça de oclusão da cat-B (ALMEIDA *et al.*, 2001). Os compostos M1 e J1 que apresentam o metal prata e paládio, respectivamente apresentaram grandes diferenças nos valores de  $IC_{50}$ , sendo que a prata potencializou a inibição da cat-B em 19 vezes e cat-L em 35 vezes, na ausência dos GAGs (**Tabela 1**). O composto L1 foi o segundo mais efetivo na inibição da cat-B ( $IC_{50}=4,90\pm 0,13$   $\mu$ M) e o terceiro para cat-L ( $IC_{50}=6,86\pm 0,18$   $\mu$ M). Contudo, GAGs reduziu o efeito inibitório sobre cat-B e potencializou sobre cat-L. Na inibição da cat-L pelo composto L1 verificamos os valores de  $IC_{50}=3,04\pm 0,24$   $\mu$ M na presença de heparina e  $IC_{50}=1,67\pm 0,07$  na presença de CS4. Na inibição da cat-L pelo composto L2 obtivemos os valores de  $IC_{50}=2,50\pm 0,14$   $\mu$ M (sem GAG) e  $IC_{50}=1,91\pm 0,05$   $\mu$ M (com heparina) e  $IC_{50}=10,34\pm 0,13$   $\mu$ M (CS4). Na inibição da cat-B, também verificamos redução do  $IC_{50}$  na presença de heparina e aumento na presença de CS4 (**Tabela 1**). Esses dados mostram que a presença dos GAGs mostra efeitos complexos no processo inibitório das catepsinas.

**Tabela 1** – Resultados obtidos de potencial inibitório sobre as enzimas Catepsina B e L utilizando compostos derivados vanilina-morfolina-etiltiossemicarbazona e complexo de paládio.

IC <sub>50</sub> μM			
COMPOSTOS	CATEPSINA B	CATEPSINA B + HEPARINA	CATEPSINA B + CS-4
M1	2,24 ± 0,04 μM	2,11 ± 0,05 μM	2,01 ± 0,01 μM
WB	45,81 ± 2,06 μM	10,19 ± 0,22 μM	5,34 ± 0,10 μM
J1	43,45 ± 3,15 μM	26,73 ± 6,09 μM	5,84 ± 0,33 μM
L1	4,90 ± 0,13 μM	7,93 ± 0,58 μM	20,87 ± 0,17 μM
L2	16,88 ± 0,20 μM	5,23 ± 0,44 μM	18,78 ± 0,23 μM
IC <sub>50</sub> μM			
COMPOSTOS	CATEPSINA L	CATEPSINA L + HEPARINA	CATEPSINA L + CS-4
M1	1,81 ± 0,05 μM	1,38 ± 0,02 μM	2,50 ± 0,15 μM
WB	13,24 ± 0,44 μM	4,62 ± 0,16 μM	5,21 ± 0,07 μM
J1	62,74 ± 3,79 μM	155,23 ± 16,41 μM	1,80 ± 0,01 μM
L1	6,86 ± 0,18 μM	3,04 ± 0,24 μM	1,67 ± 0,07 μM
L2	2,50 ± 0,14 μM	1,91 ± 0,05 μM	10,34 ± 0,13 μM

Experimento conduzido em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda λEx/λEm= 360/480nm à 37°C de acordo com metodologia. Heparina a 40 μM e CS4 a 5 μM.

Na inibição das catepsinas pelos compostos aril-N-heterocíclicos de carbenos Au(I), observamos que os compostos 1A, 3A e 4A foram potentes inibidores da cat-B na ausência da GAGs com IC<sub>50</sub> abaixo de 2 μM. Interessantemente, o composto 2A (que apresenta dois grupos diisopropil fenil ligado ao imidazol), o pior na inibição da cat-B (IC<sub>50</sub>=5,58±0,34 μM), teve seu efeito inibitório potencializado em 7 vezes na presença de CS4 (IC<sub>50</sub>=0,77±0,01 μM), contudo a inibição da cat-L (IC<sub>50</sub>=0,55±0,047 μM) foi reduzida em 2 vezes (IC<sub>50</sub>=1,05±0,06 μM) (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Resultados obtidos de potencial inibitório sobre as enzimas Catepsina B e L utilizando compostos aril-N-heterocíclicos de carbenos Au(I).

IC <sub>50</sub> μM			
COMPOSTOS	CATEPSINA B	CATEPSINA B + HEPARINA	CATEPSINA B + CS-4
1A	1,11 ± 0,006 μM	1,40 ± 0,03 μM	0,73 ± 0,01 μM
2A	5,58 ± 0,37 μM	4,06 ± 0,13 μM	0,77 ± 0,06 μM
3A	0,64 ± 0,03 μM	0,58 ± 0,01 μM	0,89 ± 0,004 μM
4A	1,57 ± 0,05 μM	2,51 ± 0,08 μM	2,65 ± 0,25 μM
IC <sub>50</sub> μM			
COMPOSTOS	CATEPSINA L	CATEPSINA L + HEPARINA	CATEPSINA L + CS-4
1A	1,42 ± 0,38 μM	1,07 ± 0,01 μM	0,37 ± 0,07 μM
2A	0,55 ± 0,047 μM	0,89 ± 0,01 μM	1,05 ± 0,06 μM
3A	1,17 ± 0,10 μM	0,53 ± 0,03 μM	0,60 ± 0,03 μM
4A	1,08 ± 0,06 μM	1,88 ± 0,041 μM	1,15 ± 0,08 μM

Experimento conduzido em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda  $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ = 360/480nm à 37°C de acordo com metodologia. Heparina a 40  $\mu$ M e CS4 a 5  $\mu$ M.

O composto 3A (contendo dois grupos de disopropil e um grupo dimetil aminopiridina ligados ao imidazol) foi o mais potente na inibição da cat-B ( $IC_{50}=0,64\pm 0,03$   $\mu$ M) e se manteve um bom inibidor na presença de heparina ( $IC_{50}=0,58\pm 0,01$   $\mu$ M) e CS4 ( $IC_{50}=0,89\pm 0,004$   $\mu$ M). Porém, foi quase 2 vezes menos potente na inibição da cat-L tendo seu efeito potencializado em 2 vezes pelos GAGs. Os efeitos do composto 4A (apresentando o grupo dimetil aminopiridina juntamente de dois grupos de disopropil fenil ligados ao imidazol) na inibição da cat-B apresentou valores de  $IC_{50}$  muito próximos na presença de GAGs, porém, maiores do que na ausência (**Tabela 2**). De forma geral, a presença da heparina não promoveu grandes alterações nos valores de  $IC_{50}$  na inibição da cat-B pelos compostos aril-N-heterocíclicos de carbenos Au(I). Efeitos mais significativos foram observados em função da presença de CS4. Cat-B é capaz de hidrolisar CS4 (TRAN, *et al.*, 2018) podendo gerar fragmentos menores de GAGs que de modo ainda desconhecido poderia favorecer mudanças estruturais e facilitar a interação dos compostos promovendo a redução nos valores de  $IC_{50}$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os compostos M1 e L1 se mostraram ser bons inibidores das catepsinas B e L, sendo que M1 foi efetivo na inibição de ambas as enzimas, além disso, M1 sofreu menos interferência dos GAGs do que o L1. Os compostos aril-N-heterocíclicos de carbenos Au(I) se apresentaram mais potentes na inibição das catepsinas do que os compostos tiosemicarbazonas e paládio, principalmente o composto 3A para cat-B e 2A para cat-L, na ausência de GAGs. Considerando a presença de GAGs, o composto 3A é uma molécula promissora para a inibição de ambas catepsinas.

De forma geral, a presença de heparina ou CS4 promoveu modificações nos valores de  $IC_{50}$ , tanto de aumento quanto de redução dos potenciais inibitórios, efeito esse dependente da enzima e da molécula, mostrando-se um fator importante a ser considerado no desenvolvimento de fármacos inibidores de catepsinas que se encontra em ambientes que possuem glicosaminoglicanos.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA PC, NANTES IL, CHAGAS JR, RIZZI CC, FALJONI-ALARIO A, CARMONA E, JULIANO L, NADER HB, TERSARIOL IL. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. **J Biol Chem**. 2001 Jan 12;276(2):944-51

CHANG WS, WU HR, WU CW, CHANG JY. Lysosomal cysteine proteinase cathepsin S as a potential target for anti-cancer. **Journal of Cancer Molecules**, v. 3, p. 5-14, 2007.

DICKINSON DP. Cysteine Peptidases of Mammals: Their Biological Roles and Potential Effects in the Oral Cavity and Other Tissues in Health and Disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. 2002;13(3):238-275.

LEÓN N, PADILLA C, PAJUELO M, SHEEN P, ZIMIC M. Cisteínoproteasas Catepsinas L de Taenia solium: Rol biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**. Lima, 2013, 30(3), 446-454.

TRAN AP, SUNDAR S, YU M, LANG BT, SILVER J. Modulation of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Sigma Increases Chondroitin Sulfate Proteoglycan Degradation through Cathepsin B Secretion to Enhance Axon Outgrowth. **J Neurosci**. 2018 Jun 6;38(23):5399-5414.