



CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DAS CHALCONAS E FLAVONÓIS NA ATIVIDADE CATALÍTICA DAS CATEPSINAS B E L

Jacqueline Cristina Chagas ¹; Dênis Pires de Lima ². Wagner Alves de Souza Júdice ³

1. Estudante de Biomedicina; e-mail: jacquelinecristinachagas@hotmail.com;
2. Professor da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Instituto de Química; e-mail: dpireslima@gmail.com;
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com.

Área do conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: catepsinas; chalconas; flavonóis; heparina; inibidores;

INTRODUÇÃO

Compartimentalizadas nos lisossomos, as catepsinas compreendem uma classe de proteases pertencentes a diferentes famílias, como aspartil proteases (catepsinas D e E), serino proteases (catepsinas A e G) e cisteíno proteases (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, e X) (BROMME *et al.*, 2002; TURK *et al.*, 2000), sendo sintetizadas como pré-pró-enzimas cujos domínios pré-pró são responsáveis por correto endereçamento, enovelamento, e inativação impedindo atividade proteolítica indesejada (WIEDERANDERS *et al.*, 2003). As catepsinas participam de processos fisiológicos como apresentação antigênica, diferenciação de queratinócitos, ativação de pró-hormônios e processos celulares basais (TURK *et al.*, 2002; TURK *et al.*, 2000; VASILJEVA *et al.*, 2007) e processos patológicos como progressão tumoral e doenças degenerativas (CHANG *et al.*, 2007). As chalconas são uma das classes mais significativas de compostos flavonoides, estão presentes em frutas e vegetais. Sua importância baseia-se em sua facilidade de síntese, química simples e a capacidade de substituir grandes números de átomos de hidrogênio, tendo assim muitos derivados biologicamente ativos (CONSTANTINESCU *et al.*, 2021). Flavonóis é uma classe de flavonóides caracterizada por um grande número de aplicações biotecnológicas e propriedades terapêuticas, estão presentes abundantemente em frutas e vegetais. Os compostos derivados de flavonóis apresentam baixo peso molecular e alta diversidade de estruturas moleculares (GERVASI *et al.*, 2022). Os flavonóis estão amplamente distribuídos e possuem muitas funções, como antioxidantes e anti-inflamatórias. Além disso, eles também atuam em muitas vias de sinalização bioquímica, interferindo em processos fisiológicos e patológicos (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Determinar os potenciais inibitórios de compostos derivados de chalconas e flavonóis, identificando os inibidores mais promissores da atividade catalítica das cisteíno proteases catepsinas B e L e analisar também suas respectivas inibições enzimáticas em conjunto com heparina.

METODOLOGIA

Compostos: foram testados 9 compostos, sendo 6 derivados da classe das chalconas e 3 derivados da classe dos flavonóis (**Figura 1**).

Substrato: o substrato Z-FRMCA foi obtido comercialmente e sua concentração determinada em função da massa molar e volume de solução preparada.

Heparina: A heparina utilizada foi obtida comercialmente e sua concentração determinada em função da massa molar e volume de solução preparada.

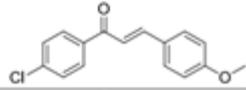
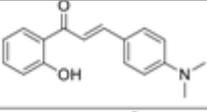
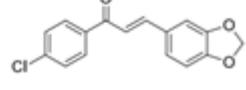
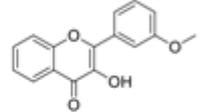
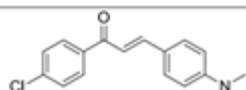
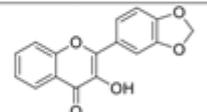
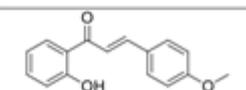
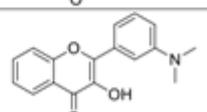
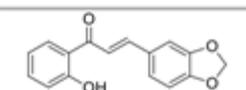
Código	Estrutura	Código	Estrutura
EM-1A		EM-2C	
EM-1B		EM-F12A	
EM-1C		EM-F12B	
EM-2A		EM-F12C	
EM-2B			

Figura 1 – Estrutura molecular das chalconas (EM) e flavonóis (EMF) e respectiva nomenclatura

Cinética enzimática: para as enzimas catepsinas B e L foram utilizados tampão acetato de sódio 100mM; EDTA 5mM; NaCl 100mM; 20% Glicerol, pH 5,5, com e sem 0,01% Triton X-100 (Catepsinas B e L, respectivamente), e ativadas com 3 mM de DTT por 5 minutos a 37°C. Os testes adicionais com presença de heparina foram feitos utilizando uma concentração de 40 µM. As atividades enzimáticas foram monitoradas por

espectrofluorimetria em equipamento espectrofluorímetro RF6000 (Shimadzu, Japão) e a hidrólise do substrato Z-FR-MCA foi acompanhada nos $\lambda_{Ex}=360\text{nm}$ e $\lambda_{Em}=480\text{nm}$. Os dados foram obtidos e tratados no software Grafit 5.0.13.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos mais efetivos para inibição enzimática da Catepsina B foram EM-2A e EM-2B, possuindo valores de $IC_{50}=1,33 \pm 0,06 \mu\text{M}$ e $IC_{50}=0,95 \pm 0,08\mu\text{M}$, respectivamente. As adições dos grupamentos metoxi e metilenodioxi não afetaram negativamente o potencial inibitório dos compostos. Ao adicionar a heparina, os compostos testados apresentaram uma diminuição de seu potencial de inibição na maioria dos testes, tendo apenas o composto EM-1A apresentado um aumento de potencial inibitório (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Potencial inibitório (IC_{50}) dos compostos sobre a Catepsina B sem e com adição de heparina.

Composto	IC_{50} (μM)	
	Catepsina B	Catepsina B + heparina
EM-1A	$4,31 \pm 0,23$	$3,13 \pm 0,16$
EM-1B	$1,56 \pm 0,04$	$3,37 \pm 0,15$
EM-1C	$4,69 \pm 0,20$	$6,87 \pm 0,40$
EM-2A	$1,33 \pm 0,06$	$3,65 \pm 0,11$
EM-2B	$0,95 \pm 0,08$	$2,08 \pm 0,04$
EM-2C	$1,75 \pm 0,04$	$2,51 \pm 0,09$
EM-F12A	$1,30 \pm 0,05$	$1,79 \pm 0,05$
EM-F12B	$0,78 \pm 0,01$	$1,88 \pm 0,06$
EM-F12C	$1,70 \pm 0,02$	$2,32 \pm 0,10$

O composto que apresentou maior atividade inibitória da Catepsina L foi o EM-F12B, com valor de IC_{50} de $0,78 \pm 0,01 \mu\text{M}$, este composto possui o grupamento metilenodioxi, que não aparenta ter afetado a capacidade de inibição do composto. Entretanto, ao adicionar heparina, compostos com grupamento metoxi (EM-F12A, EM-2A e EM-F12A) e dimetilamino (EM-1C, EM-2C e EM-F12C) tendem a variar os potenciais inibitórios, não sendo possível determinar se eles aumentam ou diminuem. Compostos com grupamento metilenodioxi (EM-1B, EM-2B e EM-F12B) tendem a ter seus potenciais inibitórios originais mantidos ou diminuídos quando em conjunto com heparina (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Potencial inibitório (IC₅₀) dos compostos sobre a Catepsina L sem e com adição de heparina.

Composto	IC ₅₀ (μM)	
	Catepsina L	Catepsina L + heparina
EM-1A	1,01 ± 0,05	5,62 ± 0,18
EM-1B	4,96 ± 0,45	0,71 ± 0,07
EM-1C	1,52 ± 0,10	0,54 ± 0,02
EM-2A	5,22 ± 0,33	2,92 ± 0,29
EM-2B	2,61 ± 0,22	2,64 ± 0,10
EM-2C	1,20 ± 0,09	4,19 ± 0,19
EM-F12A	1,12 ± 0,06	1,00 ± 0,05
EM-F12B	1,29 ± 0,07	0,77 ± 0,25
EM-F12C	4,60 ± 0,25	1,32 ± 0,03

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que compostos derivados das chalconas e flavonóis apresentam potencial inibitório significativo das Catepsinas B e L, portanto podem ser considerados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois apresentam uma gama de funções biológicas, como funções anti-inflamatórias. Os compostos EM-2B e EM-2C destacaram-se por atuarem como bons inibidores enzimáticos em ambas Catepsinas, além disso, é possível notar que não apresentam grandes variações de inibição e mantêm um padrão de resultados. Porém, quando adicionada a heparina os valores apresentaram variações significativas, ou seja, essa adição acarretou a modificação de interação entre enzima e inibidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROMME, Dieter *et al.* Thiol-Dependent Cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. **Current Pharmaceutical Design**, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12132996/>.

CHANG, W.S.; WU, H.R.; WU, C.W.; CHANG, J.Y. Lysosomal cysteine proteinase cathepsin S as a potential target for anti-cancer. **Journal of cancer molecules**, v. 3, p. 5-14, 2007. Disponível em: <https://www.airitilibrary.com/Publication/alDetailedMesh?DocID=18174256-200702-3-1-5-14-a>.

CONSTANTINESCU, Teodora *et al.* Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11306, 20 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222111306>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8582663/>.

GERVASI, Teresa *et al.* Biotechnological Applications and Health-Promoting Properties of Flavonols: an updated view. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1710, 1 fev. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23031710>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8835978/>.

PEREZ-VIZCAINO, Francisco *et al.* Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular Aspects Of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 478-494, dez. 2010. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.002>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098299710000713?via%3Dihub>.

TURK, Boris *et al.* Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 2000. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10708852/>.

TURK, Vito *et al.* Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. **Advances In Enzyme Regulation**, 2002. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12123721/>.

VASILJEVA, Olga *et al.* Emerging Roles of Cysteine Cathepsins in Disease and their Potential as Drug Targets. **Current Pharmaceutical Design**, 2007. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17311556/>.

WIEDERANDERS, Bernd *et al.* Functions of Propeptide Parts in Cysteine Proteases. **Current Protein & Peptide Science**, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14529526/>.