

CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS FLAVONOIDES ISOLADOS DE PLANTAS COMO INIBIDORES DE CATEPSINAS LISOSSOMAIS

Vanessa Borges dos Santos Vellozo¹, Virgínia Cláudia Silva², Wagner Alves de Souza Júdice³.

Graduanda do Curso de Farmácia da Universidade de Mogi das Cruzes; Mogi das Cruzes, Brasil, vanessavellozo.farma@outlook.com.¹

Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiaba, Brasil, vcsvirginia@yahoo.com.br².

Professor e pesquisador da Universidade de Mogi das Cruzes, CIIB; Mogi das Cruzes, Brasil, wagneras@umc.br³.

Área do conhecimento: Enzimologia.

Palavras chaves: Inibidores, cisteíno proteases, catepsinas K, L e B.

INTRODUÇÃO

As cisteíno proteases são conhecidas por desempenharem importante papel no metabolismo proteico celulares, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, e na degradação de proteínas de matriz extracelular e por estarem envolvidas em muitas patologias, em todas as etapas da progressão tumoral, na doença de Alzheimer, na distrofia muscular e na artrite reumatóide (LOPEZ; SILVA, 2009; LOPEZ; SILVA, 2010).

A papaína é a mais estudada das cisteíno proteases havendo uma vasta bibliografia a respeito e foi à primeira desse grupo a ter sua estrutura tridimensional determinada, consequentemente, foi considerada a enzima modelo para o estudo das outras cisteíno proteases (LOPEZ; SILVA, 2009; VERMA *et al.*, 2016). Os inibidores enzimáticos são substâncias que tem a capacidade de interferir em uma reação de catálise enzimática, assim podendo reduzir ou estacionar um processo de reação ou especificidade biológica (LOPEZ; SILVA, 2010; NELSON *et al.*, 2006; COPELAND, 2005). Esses inibidores podem ser classificados em inibidores competitivos, incompetitivos, não competitivos e inibidores irreversíveis, essa classificação é baseada na interação que o inibidor possui com o sitio ativo direto ou se outro ataque é feito no sitio da enzima por fatores alostéricos (COPELAND, 2005; GUAY *et al.*, 2000).

Flavonoides como inibidores enzimáticos lisossomais, diversos estudos descrevem a ação dos compostos flavonoides na ação antioxidante, encontrado na natureza, como pigmentos naturais nos vegetais, atuam como protetores contra agentes oxidantes. Estudos de relação aos flavonoides mostraram que são componentes de baixo peso molecular, com estrutura base C6-C3-C6, dois anéis fenil -A e B, ligados através de um anel pirano-C.

OBJETIVOS

Realizar a caracterização de compostos flavonoides isolados de plantas, na inibição das cisteíno proteases Catepsinas K, L e B recombinantes humanas, através da determinação dos valores de IC₅₀.

METODOLOGIA

Catepsina K, L e B recombinante humana foi expressa e purificada de acordo com as técnicas de Linnevers e colaboradores (Linnevers et al, 1997),

Uma série de 15 compostos flavonóides isolados de plantas e caracterizados pelo grupo da professora Profa. Dra. Virgínia C. Silva do Departamento de Química – UFMT, Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais – LPQPN. Nos ensaios cinéticos das catepsina K e L foram usados tampão acetato de sódio 100 mM e da catepsina B foi utilizado tampão glicerol 20mM, com 5 mM de EDTA, pH 5,5. Alíquotas da enzima foi pré-incubada com DTT 5 mM durante 5 minutos a 37°C. Sua hidrólise foi seguida pela medição da fluorescência (substrato *Z-FR-MCA* → $\lambda_{ex} = 360$ nm e $\lambda_{em} = 480$ nm) em um espectrofluorímetro Hitachi F2500. Determinaram-se os parâmetros cinéticos por regressão não-linear usando o programa Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltda).

Os ensaios de inibição da protease foram similares aos ensaios de hidrólise de substratos, entretanto, após a ativação enzimática e medição da atividade inicial da catepsina, procedeu-se a adição de concentrações crescentes de inibidor e medição da atividade residual.

RESULTADOS E DISCUSÃO

Após realizadas as cinéticas de inibição, utilizando como inibidores compostos flavonóides, foi possível observar que estes compostos são capazes de inibir as catepsinas K, L e B (**Tabela 1**).

O composto que apresentou menor valor de IC₅₀ para a catepsina K foi o **Composto 4**, com valor de **3,18 ± 0,08 μM**, seguido pelo **Composto 3**, cujo valor de IC₅₀ obtido foi de **4,13 ± 0,22 μM**. Este mesmo **Composto 3** também foi o mais eficiente na inibição da catepsina L, com valor de IC₅₀ igual a **4,90 ± 0,72 μM**, e também o mais eficiente na inibição da catepsina B com valor de IC₅₀ igual a **14,67 ± 1,34 μM**.

Já o **Composto 30** foi o flavonóide com menor potencial inibitório para a catepsina K, com valor de IC₅₀ igual a **300,10 ± 48,37 μM**; e o **Composto 34**, o menos efetivo na inibição da catepsina L, com IC₅₀ igual a **189,58 ± 23,81 μM**, e o **Composto 31**, o menos efetivo na inibição da catepsina B, com IC₅₀ igual a **601,78 ± 102,48 μM**.

O **Composto 8** inibiu as catepsinas K e L em uma mesma faixa de concentração (**14,65 ± 0,53 μM** para catepsina K e **14,45 ± 0,97 μM** para catepsina L).

Os compostos 9, 32 e 34 não foram capaz de inibir satisfatoriamente a catepsina B. Durante os ensaios em concentração aproximada de 2 mM verificamos inibição de apenas 20%, significando que a catepsina B ainda apresentava 80% de atividade residual.

Tabela 1 – Valor de IC₅₀ dos compostos flavonoides frente às catepsinas K, L e B.

Flavonóides	IC ₅₀ (μM)		
	Catepsina K	Catepsina L	Catepsina B
Composto 1	9,50 ± 0,52	17,31 ± 1,00	99,24 ± 4,81
Composto 2	8,55 ± 0,80	17,97 ± 0,99	34,12 ± 0,57
Composto 3	4,13 ± 0,22	4,90 ± 0,72	14,67 ± 1,34
Composto 4	3,18 ± 0,08	28,47 ± 3,66	30,61 ± 4,00
Composto 7	63,93 ± 6,33	102,16 ± 8,48	222,36 ± 27,30
Composto 8	14,65 ± 0,53	14,45 ± 0,97	84,56 ± 3,09
Composto 9	18,49 ± 1,50	112,22 ± 5,57	Não Inibe

Composto 10	44,87 ± 3,40	68,96 ± 5,73	343,22 ± 24,12
Composto 11	19,90 ± 1,03	16,74 ± 0,07	155,55 ± 8,02
Composto 30	300,10 ± 48,37	92,90 ± 2,23	500,57 ± 113,55
Composto 31	109,21 ± 15,00	54,81 ± 5,49	601,78 ± 102,48
Composto 32	157,35 ± 18,60	26,83 ± 1,48	Não Inibe
Composto 33	116,10 ± 14,77	30,02 ± 1,58	125,01 ± 20,56
Composto 34	13,24 ± 2,22	189,58 ± 23,81	Não Inibe

Condições experimentais: as enzimas foram pré-incubadas em tampão acetato de sódio 100 mM, com 5 mM de EDTA, pH 5,5, 2 mM de DTT, a 37°C e sob agitação constante.

Estudos mostraram que compostos flavonoides polihidroxilados provenientes de Myrtaceae são promissores inibidores de catepsina B (Ramalho, et al, 2015). Outros estudos indicam que o flavonóide quercetin pode ser usado na prevenção e tratamento de Aneurisma de Aorta Abdominal (AAA) via bloqueando a resposta inflamatória e inibindo proteases como catepsinas B e K, além de metaloproteases, envolvidas na patogênese desta doença Wang, et al 2012). Além disso, Zend e cols, (2006) estudando flavonoides de *Taxodium mucronatum* (Taxodiaceae) e *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) encontraram moléculas capazes de inibir catepsina B e K, sendo mais específicos para catepsina B.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que os compostos flavonoides 3 e 8 são fortes candidatos para desenvolvimento de drogas em patologias em que as cisteíno proteases catepsinas K, L e B estejam envolvidas.

AGRADECIMENTOS: FAEP, FAPESP, CNPq, CAPES

REFERÊNCIAS

- COPELAND, R.A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**. Wiley: New Jersey, 2005.
- LINNEVERS, C.J.; MCGRATH, M.E.; ARMSTRONG, R.; MISTRY, F.R.; BARNES, M.G.; KLAUS, J.L.; PALMER, J.T.; KATZ, B.A.; BROMME, D. **Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex**. Protein Science, v. 6, p. 919-921, 1997.
- LOPEZ, R. E. Silva. **Inibidores de proteases oriundas de plantas: uma abordagem útil para o desenvolvimento de novos fármacos**. Rio de Janeiro, RJ: Revista Fitos Eletrônica, v. 04, n. 01, 2009.
- LOPEZ, Raquel E. da Silva. **Proteases de Leishmania: Novos Alvos Para O Desenvolvimento de Novos Fármacos**. Química Nova, Rio de Janeiro, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER, A.L. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

PRATT, R. On the definition and classification of mechanism-based enzyme inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 1323-1326, 1992.

RAMALHO, S.D.; SOUZA, L.R.;BURGER, M.C.; LIMA, M.I.; SILVA, M.F.; VIEIRA,P.C. Evaluation of flavonols and derivatives as human cathepsin B inhibitor. **Nat Prod Res**, v.4 , p. 2212, 2015.

SIEWINSKI, M.; GUTOWICZ, J.; KIELAN, W.; BOLANOWSKI, M. Cysteine peptidase inhibitors and activator(s) in urine of patients with colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, China, v. 11, n. 6, p. 446-449, 1994.

TANIGUCHI, K.; TOMITA, M.; KOMINAMI, E.; UCHIYAMA, Cysteine proteinases in rat dorsal root ganglion and spinal cord, with special reference to the co-localization of these enzymes with calcitonin gene-related peptide in lysosomes. **Brain Research**, Japan, v. 601, n.1-2, p.143-153, 1993.

WANG, L.; WANG, B.; LI, H.; LU, H.; QIU, F.; XIONG, L.; XU, Y.; WANG, G.; LIU, X.; WU, H.; JING, H. Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice. **Eur J Pharmacol**, v.133, p. 41, 2012.

ZENGA,B.; PANA, B.; TANA, J.; XIONGA, Y.;ZHANG. Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 1247-1252, 2006.