

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL / MG

BEATRIZ LARA MERCHAM DOS SANTOS

CATEPSINA B E CATEPSINA L: ESTUDO DE INIBIDORES POR *MOLECULAR DOCKING*

ALFENAS/MG

2025

BEATRIZ LARA MERCHAM DOS SANTOS

CATEPSINA B E CATEPSINA L: ESTUDO DE INIBIDORES POR *MOLECULAR DOCKING*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Farmacêuticas, pela Universidade Federal de
Alfnas.

Área de concentração: Química Farmacêutica e Medicinal
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marcia Paranho Veloso
Coorientador: Me. Caio Pacifico Mariano

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Santos, Beatriz Lara Mercham dos .
Catepsina B e Catepsina L : estudo de inibidores por *Molecular Docking*
/ Beatriz Lara Mercham dos Santos. - Alfenas, MG, 2025.
39 f. : il. -

Orientador(a): Marcia Paranho Veloso.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.
Bibliografia.

1. Catepsinas. 2. Inibidores de cisteína-proteases. 3. Simulação de
Ancoragem Molecular. I. Veloso, Marcia Paranho , orient. II. Título.

Beatriz Lara Mercham dos Santos

Catepsina B e Catepsina L: Estudo de inibidores por *Molecular Docking*

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de Curso, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de bacharel em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 04 de novembro de 2025

Prof^a Dr^a Marcia Paranho Veloso

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:  Documento assinado digitalmente
MARCIA PARANHO VELOSO
Data: 11/11/2025 14:50:39 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof Dr Nelson José Freitas da Silveira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:  Documento assinado digitalmente
NELSON JOSE FREITAS DA SILVEIRA
Data: 11/11/2025 15:39:22 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Me. Leonardo Pereira de Araújo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:  Documento assinado digitalmente
LEONARDO PEREIRA DE ARAUJO
Data: 11/11/2025 16:24:54 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

RESUMO

A busca contínua e incessante de pesquisadores por substâncias efetivas contra doenças, em especial, as crônicas não transmissíveis, cresce exponencialmente devido à diversidade biológica brasileira e a busca da melhora do bem-estar da população. Porém, a partir da identificação e caracterização desses compostos, se faz necessário a realização de testes para avaliar a eficácia frente ao alvo terapêutico. As cisteína-proteases B e L, por exemplo, representam alvos moleculares associados à patogênese de diversas doenças de relevância clínica, como o câncer e patologias neurodegenerativas. Os estudos *in vivo* e *in vitro*, geralmente, são muito caros e executar a triagem de todas as substâncias-protótipos que podem atuar frente a estes alvos encarece a pesquisa. Com o objetivo de racionalizar os estudos, as técnicas de Modelagem Molecular, mais especificamente, Ancoragem ou Ancoramento Molecular podem ser utilizadas, sendo uma técnica prevista no planejamento racional de fármacos. O objetivo do estudo visa prever a melhor conformação e tipo de ligação para a molécula-alvo em estudos, e predição de propriedades físico-químicas dos compostos testes. As etapas da metodologia foram a seleção dos alvos moleculares, preparo das Catepsinas B e L, preparo dos ligantes, definição do sítio ativo, realização do *Molecular Docking*, predição das propriedades físico-químicas e análise dos resultados. Os resultados apontam para a relevância de halogênios e grupamentos oxigenados na estrutura para favorecer a inibição, além de interações com aminoácidos específicos. A partir deste estudo, foi possível estabelecer um alinhamento entre os estudos *in vitro* e a avaliação *in silico* conduzida, com um possível *insight* para o mecanismo de ação destes candidatos a protótipos.

Palavras-chave: catepsinas; inibidores de cisteína-proteases; simulação de Ancoragem Molecular.

ABSTRACT

The continuous and relentless search by researchers for substances that are effective against diseases, especially chronic non-Communicable diseases, is growing exponentially due to Brazil's biological diversity and the quest to improve the well-being of the population. However, once these compounds have been identified and characterized, tests must be carried out to assess their efficacy against the therapeutic target. Cysteine proteases B and L, for example, represent molecular targets associated with the pathogenesis of several clinically relevant diseases, such as cancer and neurodegenerative pathologies. *In vivo* and *in vitro* studies are generally very expensive, and screening all prototype substances that may act on these targets makes research costly. In order to streamline studies, Molecular Modeling techniques, more specifically Molecular Docking, can be used, which is a technique provided for in rational drug design. The objective of the study is to predict the best conformation and type of binding for the target molecule in studies and to predict the physicochemical properties of the test compounds. The steps of the methodology were the selection of molecular targets, preparation of Cathepsins B and L, preparation of ligands, definition of the active site, performance of Molecular Docking, prediction of physicochemical properties, and analysis of results. The results point to the relevance of halogens and oxygenated groups in the structure to favor inhibition, in addition to interactions with specific amino acids. Based on this study, it was possible to establish an alignment between the *in vitro* studies and the *in silico* evaluation conducted, with a possible insight into the mechanism of action of these prototype candidates.

Keywords: cathepsins; cysteine proteases inhibitors; Molecular Docking simulation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 OBJETIVO GERAL.....	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3 JUSTIFICATIVA.....	7
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
4.1 CATEPSINAS.....	8
4.1.1 Catepsina B e catepsina L.....	8
4.1.2 Patologias associadas.....	9
4.1.2.1 Câncer.....	9
4.1.2.2 Doenças cardiovasculares.....	9
4.1.2.3 Doenças articulares.....	10
4.1.2.4 Doenças neurodegenerativas.....	11
4.2 ALVOS TERAPÊUTICOS.....	11
4.2.1 Farmacoterapia.....	12
4.2.1.1 Inibidores endógenos.....	12
4.2.1.2 Inibidores naturais.....	13
4.2.1.4 Outros inibidores.....	17
4.3 BIOINFORMÁTICA.....	18
4.3.1 Modelagem molecular.....	18
4.3.1.1 Ancoramento molecular.....	19
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6.1 CATEPSINA L.....	22
6.2 CATEPSINA B.....	26
7 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia das doenças crônicas não transmissíveis são o foco de pesquisas para a busca e desenvolvimento de fármacos, visando o bem estar biopsicossocial do paciente. Neste contexto, destaca-se a participação das proteases em diferentes fases da enfermidade, dentre as quais, um dos principais exemplos consistem nas cisteína-proteases (Vidak *et al.*, 2019). Em situações fisiológicas normais, suas ações ajudam a manter a homeostase, porém em situações de disfunção, ocorre uma reação proteolítica exacerbada que resulta na morte celular de células saudáveis (Turk *et al.*, 2012). Nesses casos, há uma relação direta com a progressão da doença, pois a indução à morte por apoptose, ferroptose ou piroptose, permite a locomoção de células cancerígenas para outros tecidos, e o desgaste de cartilagens que ocorre em doenças ósseas degenerativas, sendo as principais envolvidas as Catepsinas B e L (Xie *et al.*, 2023).

Com o objetivo de produzir fármacos mais específicos, efetivos e seguros, junto a acrescentar outras opções de tratamentos que atacam outras vias das doenças, de forma mais sustentável, são usadas as técnicas de planejamento racional de fármacos, como a ancoragem molecular, para investigação de moléculas potencialmente bioativas (Barreiro *et al.*, 1997). Dentro desse grupo encontram-se as moléculas bioativas naturais, obtidas pela extração de substâncias advindas de animais, fungos, plantas e outros microrganismos, que podem ser usadas como protótipos e base para síntese de outros compostos (Oliveira *et al.*, 2018).

Os inibidores das Catepsinas, outro nome para família cisteína-proteases, são estudados desde a década de 1980 por pesquisadores ao redor do mundo, porém os estudos não prosseguiram devido aos efeitos colaterais (Rot *et al.*, 2024). Esta pesquisa tem como prioridade a coletânea das informações e realizar o estudo de ancoragem molecular, para selecionar compostos favoráveis energeticamente e observar as interações destes com as biomoléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a interação das substâncias inibidoras com as Catepsinas B e L por meio do ancoramento molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Compreendem objetivos específicos deste trabalho:

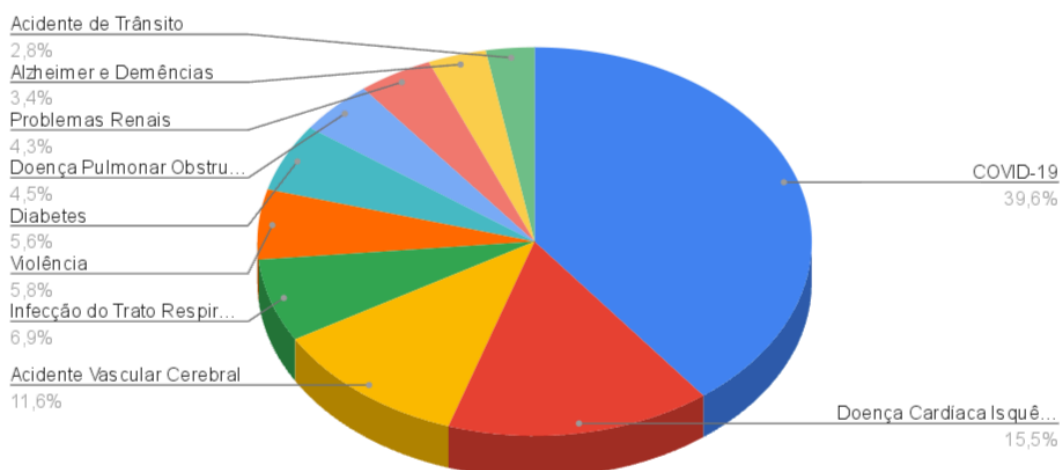
- a) calcular a afinidade (em kcal/mol) entre as substâncias (ligantes) e as biomacromoléculas (Catepsinas);
- b) identificar interações intermoleculares;
- c) calcular propriedades físico-químicas dos candidatos a protótipos.

3 JUSTIFICATIVA

A evolução do conhecimento fisiopatológico de doenças com a elucidação dos mecanismos de ação moleculares, são meios de detecção de possíveis alvos terapêuticos, logo, podem ser usados para o planejamento racional de fármacos. Resultando na seletividade, segurança e especificidade, no qual há diminuição dos efeitos colaterais, reações adversas a medicamentos e menor desperdício de recursos materiais na fase de síntese.

Visto que as Catepsinas B e L estão envolvidas nas enfermidades mais prevalentes no Brasil, como Doenças Cardiovasculares, é de suma importância o desenvolvimento e planejamento racional de fármacos, sendo sustentado pelos estudos epidemiológicos. Abaixo há um gráfico (Figura 1) sobre as doenças prevalentes em 2021 no Brasil.

Figura 1 - Principais causas de morte em 2021, Brasil (por 100.000 habitantes)



Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde (2025).

No gráfico adaptado, com o destaque para as Doenças Cardiovasculares e Neurodegenerativas no qual há comprovação do envolvimento das Catepsinas na fisiopatologia, ambas doenças são responsáveis por aproximadamente 30% das principais causas de morte, assim 30.000 pessoas morreram em decorrência dessas patologias.

Portanto, com o uso da Ancoragem Molecular é possível realizar uma triagem virtual e direcionar os melhores compostos-protótipos para serem os candidatos em testes *in vitro* e *in vivo*.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 CATEPSINAS

Catepsinas são enzimas localizadas principalmente nos lisossomos e endossomos, porém estudos recentes demonstraram a presença em citoplasma, núcleo e meio extracelular, essa última associada a processos patológicos (Vidak *et al.*, 2019). Podem ser classificadas de acordo com o aminoácido presente no sítio ativo, se ramificando em serino-proteases (Catepsinas A e G), aspartil-proteases (Catepsinas D e E) e cisteína-proteases (Catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W) (Yadati *et al.*, 2020).

Em situações fisiológicas, podem atuar de forma intra e extracelular: dentro da célula realizam funções como a degradação de citocinas e quimiocinas durante o processo imunológico a fim de manter a homeostase celular; enquanto no meio extracelular agem na remodelação da matriz extracelular por meio da proteólise de colágeno e outras substâncias (Biasizzo *et al.*, 2022; Vidak *et al.*, 2019). Para que suas ações sejam executadas é necessário um pH mais ácido, para maioria das Catepsinas, pois o pH mais alcalino inibe suas funções (Turk *et al.*, 2012). Quando há uma desordem nessa enzima, suas ações anormais resultam na progressão de patologias como cânceres, quadros inflamatórios e doenças neurológicas (Rot *et al.*, 2024), tornando se um biomarcador, um alvo terapêutico de interesse.

4.1.1 Catepsina B e catepsina L

As cisteína-proteases B e L estão associadas à patogênese de diversas doenças tais como câncer, neurodegenerativas e cardíacas, sendo consideradas importantes alvos terapêuticos moleculares. As Catepsinas são sintetizadas na forma de pré-enzimas inativas pelo retículo endoplasmático, e suas ativações ocorrem após uma cascata de reações, e a forma ativa é armazenada no lisossomos para ser secretada ou agir internamente (Xie *et al.*, 2023). O pH é um fator determinante para suas ações proteolíticas, a faixa de pH com atividade ótima pode 3.5 a 6.0, a Catepsina B expõe seu sítio ativo devido a abertura do *loop* oclusivo em condições ambientais ácidas, porém perde sua ação em pH neutro e alcalino (Stoka *et al.*, 2023).

Ambas são expressas de forma constitutiva, ou seja, a produção é constante e independente do estado metabólico do organismo. Porém, quando há uma falha na regulação ou funcionalidade, surgem patologias devido a exacerbação da sua atividade. Há relatos de

envolvimento das Catepsinas B e L em cânceres, doenças cardiovasculares, articulares e neurodegenerativas (Vidak *et al.*, 2019; Rot *et al.*, 2024).

4.1.2 Patologias associadas

4.1.2.1 Câncer

Classificado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer é uma doença resultante de uma alteração genética causada por agentes químicos, físicos e biológicos, no qual há uma proliferação celular desordenada que gera mais alterações, resistência aos mecanismos de apoptose e mudança do microambiente extracelular. As Catepsinas não estão envolvidas no aparecimento do câncer e sim na sua progressão, ou seja, quando estão disfuncionais, há a quebra de colágeno, fibroblastos, glicoproteínas e outras proteínas presentes na matriz, permitindo a adesão e invasão da célula cancerígena nos tecidos (Deng *et al.*, 2024; Rudzinska, 2019).

Como as Catepsinas L e B estão expressas de forma constitutiva por todo o organismo, são as mais estudadas e envolvidas no processo de progressão, assim se faz pertinente o conhecimento do mecanismo de ação nessa patologia. A catepsina B alterada está envolvida no aumento da degradação da matriz extracelular e melhora a capacidade de resistência das metaloproteases frente à degradação (Theocharis *et al.*, 2014). O mecanismo da catepsina L disfuncional no câncer é em conjunto com a catepsina S, no qual ambas degradam a *E-cadherin* resultando na menor adesão das células umas às outras, permitindo a invasão tecidual de células cancerígena (Almaki *et al.*, 2023; Mendonsa; Gumbiner, 2018).

Em conjunto, ambas atuam promovendo a angiogênese no tecido endotelial afetado, por estimular fatores pró-angiogênicos direta ou indiretamente, provendo o material necessário para o crescimento das células cancerígenas e uma porta de entrada para a corrente sanguínea (Lopes-Bastos; Jiang; Jun Cai, 2016; Rot *et al.*, 2024). Portanto, são marcadores importantes para detectar o câncer e sua progressão.

4.1.2.2 Doenças cardiovasculares

As cisteína-proteases desempenham um papel fundamental no prognóstico das doenças cardiovasculares por estarem atreladas a degradação da matriz extracelular de colágeno e elastina, no qual são responsáveis pela dilatação e contração dos vasos sanguíneos,

além de promoverem processos inflamatórios, migração celular e alteração do metabolismo lipídico (Cai; Xu; Liu, 2024).

A rigidez arterial decorrente da queda de colágeno e elastina devido a ação proteolítica das Catepsinas gera o aumento da pressão arterial, esta degradação também está associada com a fragilidade arterial que resulta em aneurismas (Spinelli; Guimarães, 2020; Abisi *et al.*, 2007).

Junto a rigidez, como há a perda da matriz extracelular, as placas de gordura não tem mais adesão a parede, tornando-as instáveis com a possibilidade de se locomover pelo vaso sanguíneo e ir para vasos de calibre menor, conseqüentemente aumentando o risco de embolias, obstrução do fluxo sanguíneo e aterosclerose em outra veias e artérias (Biasizzo *et al.*, 2022; Cai; Xu; Liu, 2024).

Em adição, são capazes de modificar estruturalmente a lipoproteína de baixa densidade (LDL) resultando em um acúmulo de lipídeos dentro de macrófagos que vão para o vaso devido o processo inflamatório exacerbado pelas Catepsinas, enquanto a modificação da lipoproteína de alta densidade (HDL) diminui seu transporte no sangue, impedindo a ação anti-aterogênica (Cai;Xu;Liu, 2024).

Reconhecida como fator de risco pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, a obesidade é uma doença crônica inflamatória que possui envolvimento das Catepsinas L, S e K, em estudos usando inibidor de catepsina L em ratos demonstrou a perda de peso significativa (Lafarge; Clément; Guerre-Millo, 2011).

4.1.2.3 Doenças articulares

As Catepsinas possuem participação na progressão das doenças articulares, principalmente osteoartrite e artrite reumatoide, determinado pela quantificação das cisteínas-proteases B, L, K e S no líquido sinovial. Ocorre pela quebra de colágeno e da proteína central de proteoglicano específico da cartilagem, leva ao desgaste das cartilagens articulares e inflamação local (Vidak *et al.*, 2019).

A catepsina L é mais presente nos estágios avançados da doença, age destruindo os componentes da cartilagem contribuindo para erosão óssea, junto a catepsina B tem o mecanismo de antagonizar a renovação da cartilagem e regular as atividades das metaloproteinases de matriz, bloqueando os inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz (Biasizzo *et al.*, 2022).

4.1.2.4 Doenças neurodegenerativas

São distúrbios relacionados ao sistema nervoso central (SNC), progressivos e de caráter crônico, que resultam em danos neuronais, acometem crianças, jovens, adultos e idosos, sendo a última população a mais afetada. Isto decorre pelo envelhecimento, culminando em um declínio fisiológico devido ao acúmulo de danos no DNA, estresse oxidativo celular e aumento de citocinas inflamatórias (Carvalho; Kostic; Rodrigues, 2023).

Desordens como Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP) possuem a participação ativa das Catepsinas B, L e D no processo de neuro inflamação, sendo quantificados em quantidades superiores no líquido cefalorraquidiano, plasma e placas amiloides (Stoka; Turk; Turk, 2016; Biasizzo *et al.*, 2022). Esse aumento pronunciado se deve a produção e secreção pela micróglia, fagócito mononuclear presente no tecido cerebral com ação de proteção por induzir a resposta inflamatória contra agressores, porém com o acúmulo de danos ao DNA pode gerar uma resposta exacerbada e um comportamento bizarro do tipo M1 (pró inflamatório) (Colonna; Butovsky, 2017).

A catepsina B chega ao citosol devido a membrana danificada, o que ativa apoptose e células inflamatórias como a interleucina IL-1 α , e inativa proteínas anti apoptóticas, o que ocasiona a destruição de neurônios (Hook *et al.*, 2020). Ademais, os níveis de catepsina L decresce com o passar do tempo, como demonstrado em estudos *in vivo*, o impacto do decréscimo ainda não foi elucidado na literatura (Nakanishi, 1994).

4.2 ALVOS TERAPÊUTICOS

Os resultados de pesquisas clínicas demonstram o envolvimento das Catepsinas na progressão de doenças crônicas, além de possibilitar a investigação por inibidores das cisteína-proteases. São descritos ensaios baseados na relação estrutura-atividade por programas computacionais, no qual o foco é o sítio ativo de cada catepsina de acordo com a prevalência na doença; e estudos em modelos animais pela inibição ou supressão do gene com o resultado expresso em remissão e melhora do quadro clínico em questão (Almaki *et al.*, 2023).

Entretanto, é importante salientar que as Catepsinas são essenciais em processos fisiológicos, ou seja, ao escolher como alvo terapêutico é necessária a cautela em um processo de inibição, de forma que o foco esteja na atividade desregulada da proteína, a fim de reduzir efeitos colaterais.

4.2.1 Farmacoterapia

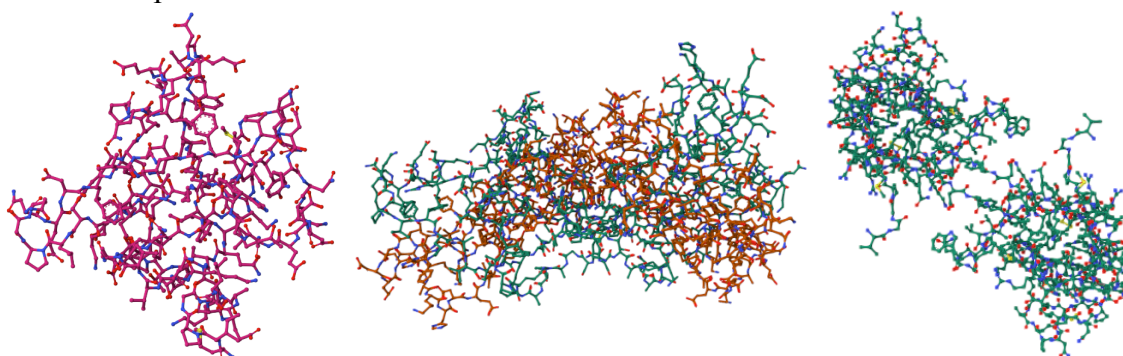
Durante os anos foram descobertos inibidores endógenos, reguladores da atividade das Catepsinas, e naturais, advindos de microrganismos. Em conjunto foram sintetizadas substâncias com potencial para fármaco, para catepsina B e L, em estudos pré-clínicos, e planejamento racional de anticorpos monoclonais inibidores (Xie *et al.*, 2023; Stoka; Turk; Turk, 2016).

4.2.1.1 Inibidores endógenos

São substâncias produzidas pelo próprio organismo com o objetivo de cessar a atividade enzimática molecular e são inibidores reversíveis, sendo as responsáveis por essa regulação as Cistatinas tipo 1, 2, 3 e do tipo 4 que são inibidoras das Catepsinas (Kos *et al.*, 2000). As correspondentes do tipo 1 são a Estefina A Estefina B (Figura 2), presentes em células epiteliais e demais tecidos, respectivamente. A Cistatina C (Figura 2) é a principal representante do tipo 2 e está presente em tecidos e fluidos biológicos, e os cininogênios representantes do tipo 3 estão localizados no plasma e secreções (Turk *et al.*, 2012).

Segundo Turk e colaboradores (2012), as cistatinas possuem três regiões necessárias para que ocorra a inibição das Catepsinas, uma região N-terminal e dois *hairpin loops*. A interação ocorre pela subunidade amino terminal que decorre da mudança conformacional da catepsina, os *loopings* atuam como um ponto a mais de ligação, o segundo é responsável por estabilizar a interação (Pavlova; Björk, 2002). As interações intermoleculares são em sua maioria hidrofóbicas, por isso são reversíveis, apesar das cistatinas diferenciarem Catepsinas endógenas e exógenas, possuem uma menor ação contra as extracelulares devido ao *loop* estrutural (Turk *et al.*, 2012).

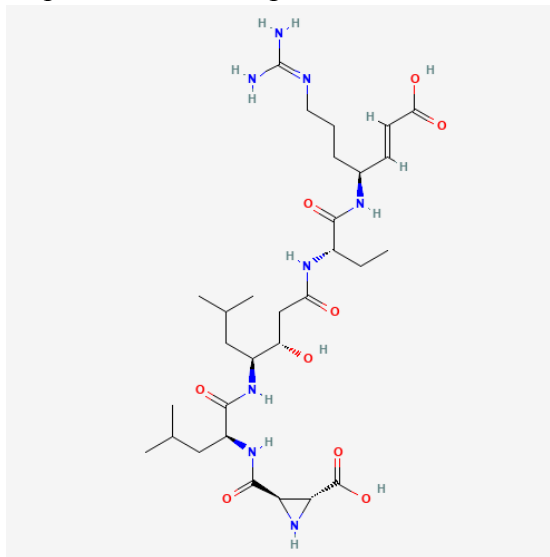
Figura 2 - Representações tridimensionais dos alvos estefina A, estefina B e cistatina C, respectivamente



Fonte: Adaptado de Pavlova e Björk (2002); Jenko Kokalj *et al.* (2007); Orlikowska *et al.* (2012).

pH baixo, possui seletividade para cisteína-proteases embora seja clivado por serino proteases sendo uma inibição irreversível por alquilar a enzima (Powers *et al.*, 2002).

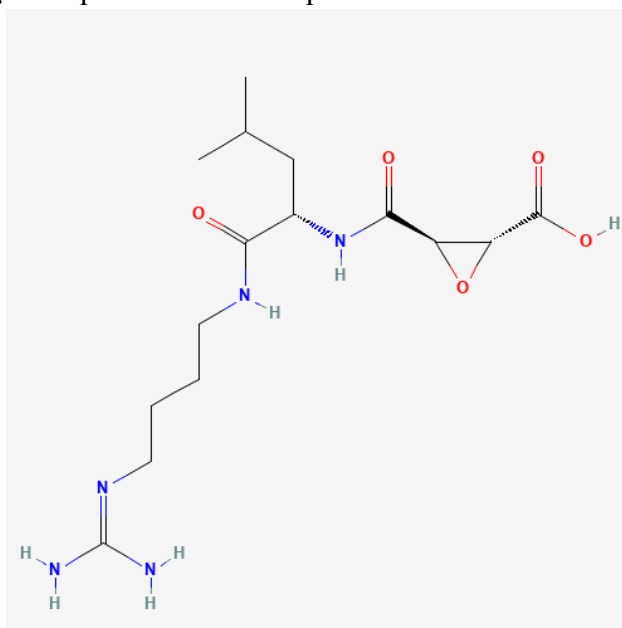
Figura 4 - Representação esquemática do composto Mirazidina-A



Fonte: Pubchem (Kim *et al.*, 2025).

O composto natural E-64 (Figura 5), isolado do fungo *Aspergillus japonicus*, é um peptídeo ligado grupamento epóxi-succinil, o núcleo farmacofórico é atacado pelo sítio ativo das Catepsinas, dando origem a ligação tioéter, alquila a protease que acarreta na abertura do anel epóxi. Esse mecanismo permite ligações covalentes, por isso é considerado um inibidor irreversível (Powers *et al.*, 2002; Vidal-Albalat; González, 2016).

Figura 5 - Representação esquemática do composto E-64



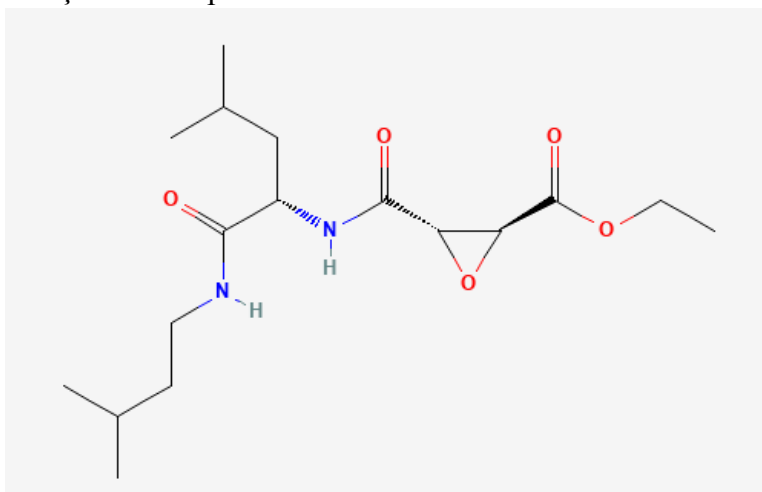
Fonte: PubChem (Kim *et al.*, 2025).

4.2.1.3 Inibidores sintéticos

A partir das estruturas de inibidores naturais, vieram os sintéticos como forma de adicionar outros pontos de interação, a fim de adquirir maior estabilidade e reduzir a energia necessária para ligação (Vidal-Albalat; González, 2016).

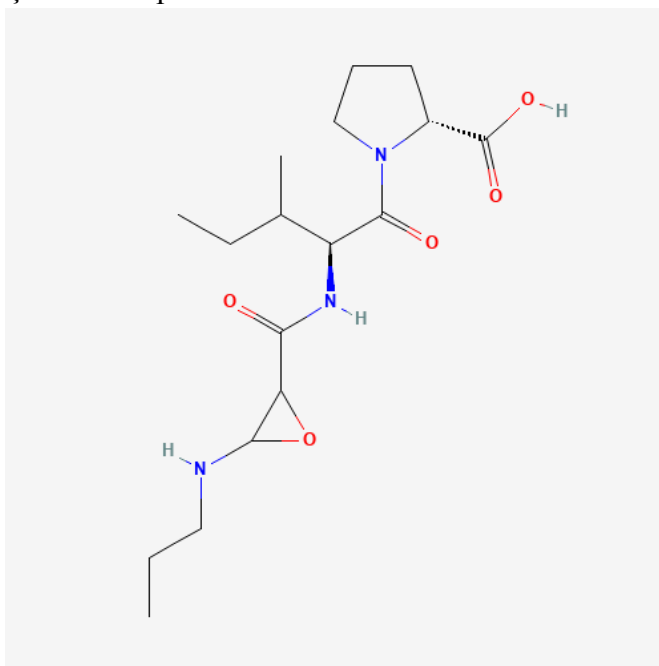
A grande parte dos inibidores sintéticos advém da estrutura do peptídeo epóxi-succinil E-64, devido a ligação tioéster formada e a maior seletividade para catepsina B (Kos; Mitrovic; Mikovic, 2014), são os compostos E-64d, CA074 e CA074Me. A molécula E-64d (Figura 6) é um pró-fármaco, ou seja, no intestino o grupamento éster é hidrolisado formando o E-64c com alta seletividade para as Catepsinas B e L (Powers *et al.*, 2002). As moléculas CA074 e CA074Me (Figura 7 e 8) possuem a mesma estrutura porém diferem por um metil éster, a primeira exibe ótima atividade por conta do grupamento carboxil interagir com o *loop* de oclusão, entretanto em pH neutro tem a permeabilidade reduzida, o segundo composto já apresenta menor seletividade e maior capacidade de autofagia celular (Kos; Mitrovic; Mirkovic, 2014).

Figura 6 - Representação do composto E-64d



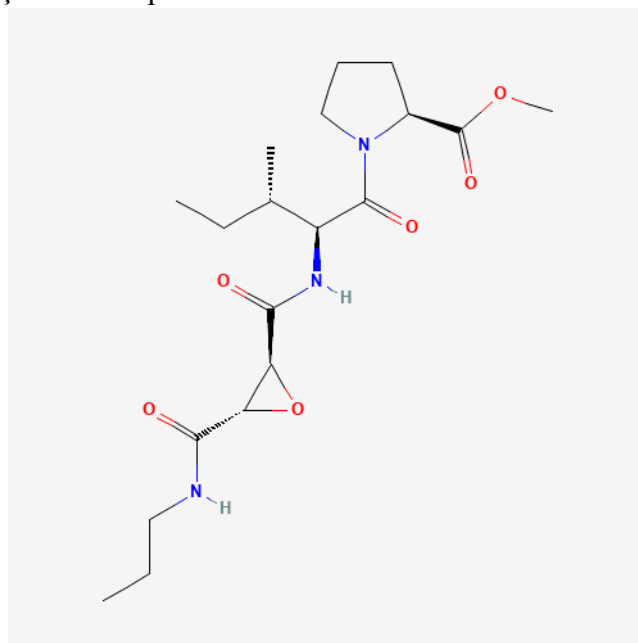
Fonte: Pubchem (Kim *et al.*, 2025).

Figura 7 - Representação do composto CA074



Fonte: PubChem (Kim *et al.*, 2025).

Figura 8 - Representação do composto CA074 Me

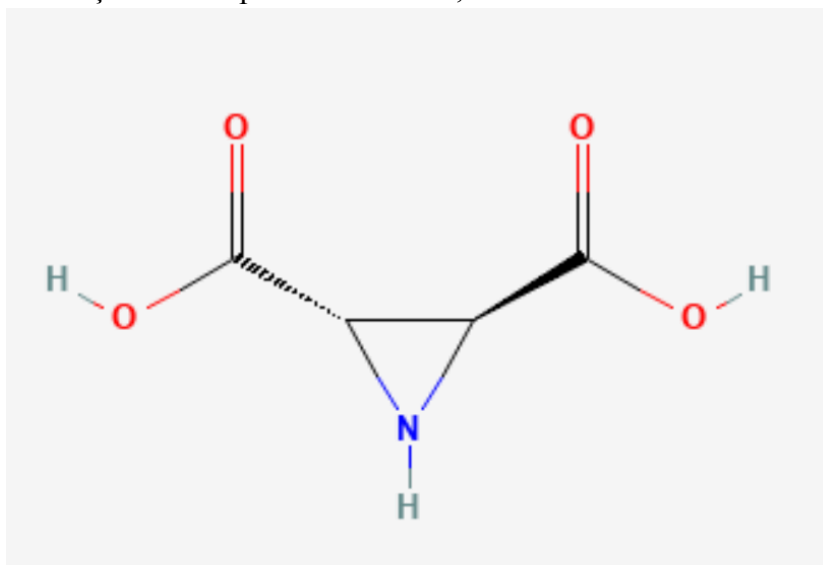


Fonte: PubChem (Kim *et al.*, 2025).

Os derivados de aziridinas possuem facilidade de protonar devido ao átomo de nitrogênio no anel, isso implica em uma atividade ótima em pH baixos, a molécula representante é a aziridina-2,3-dicarboxilato (Figura 9) (Vidal-Albalat; González, 2016). Por conta da ação dos grupamentos nitrogenados, as nitrilas foram alvos de estudo como inibidores de cisteína-proteases reversíveis e irreversíveis. O mecanismo de ataque nucleofílico é semelhante aos outros, diferindo na formação de isotioamida no sítio ativo do

tipo covalente, sendo o principal representante o azapeptídeo nitrila (Kos; Mitrovic; Mirkovic, 2014).

Figura 9 - Representação do composto aziridina-2,3-dicarboxilato



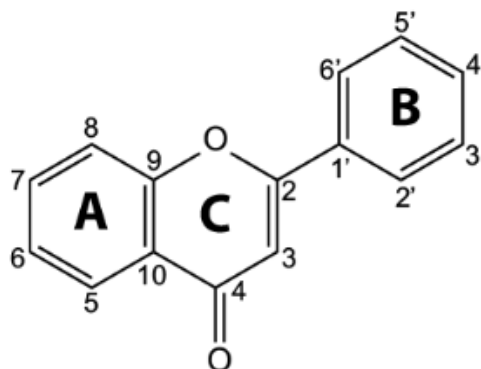
Fonte: Pubchem (Kim *et al.*, 2025).

4.2.1.4 Outros inibidores

Para além, foram desenvolvidos anticorpos monoclonais com o propósito de maior seletividade do alvo terapêutico e minimizar a degradação que ocorre durante a farmacocinética, o anticorpo mAb 2A2 desenvolvido a partir de uma sequência próxima ao *loop* de oclusão, considerada um epítipo, resultando na modulação da atividade de degradação da matriz extracelular ao alterar a estrutura conformacional e estabilizar a atividade exógena e endógena (Mirković *et al.*, 2009).

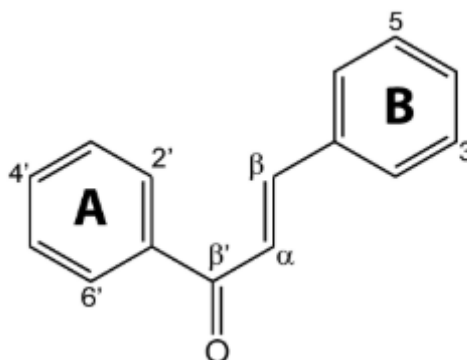
A medicina tradicional perdura em diversos países e os metabólitos secundários de plantas apresentam grande importância terapêutica, sendo esses saberes resgatados na medicina atual, diante disso substâncias como flavonoides (Figura 10) e seus derivados como as chalconas (Figura 11) são testados como inibidores das Catepsinas (Vidal-Albalat;González, 2016). Segundo De Sousa e colaboradores (2020), os flavonoides extraídos não são competidores ou parcialmente competidores, ou seja, se ligam à sítios alostéricos da enzima e o possível mecanismo inibitório foi ilustrado pelo trabalho de Ramalho e colaboradores (2015), resultados demonstraram a importância dos grupamentos hidroxilas ligadas ao anel B e C dos flavonóides .

Figura 10 - representação estrutural dos flavonóides



Fonte: Simões *et al.* (2017).

Figura 11 - Representação estrutural das chalconas



Fonte: Simões *et al.* (2017).

4.3 BIOINFORMÁTICA

A Bioinformática compreende uma área interdisciplinar como resultado da fusão de técnicas computacionais e saberes biológicos. Surgiu em meados da década de 1980 a partir da Biologia Molecular e em estudos de genomas, gerando um banco de dados genético numeroso que facilita a busca de sequências para pesquisas científicas, sendo o principal exemplo o *GenBank* (Araújo *et al.*, 2008; Sayers *et al.*, 2025). Suas aplicações descritas na literatura são extensas, o que inclui o desenho de novos fármacos, saberes compilados de genes, busca de proteínas envolvidas em processos patológicos e comparação de resultados encontrados experimentalmente (Araújo *et al.*, 2008).

4.3.1 Modelagem molecular

A Modelagem Molecular consiste no conjunto de técnicas com aplicação no planejamento racional de compostos bioativos, cuja a premissa é facilitar a determinação de

moléculas ativas por meio de programas computacionais que calculam ângulos de torção, força e energia de ligações, e a interação com os alvos terapêuticos (Sant'Anna, 2009). Com a evolução tecnológica e aprimoramento de técnicas, o termo CADD (*Computer Aided Drug Design* ou Desenho de Fármacos assistido por Computador) se tornou forte nos meios acadêmicos e industriais. Iniciado no Brasil pelo grupo do Professor Dr. Eliezer Barreiro na Universidade Federal do Rio de Janeiro em 1990, o CADD tem como objetivo a determinação da conformação estrutural das substâncias possivelmente bioativas por meio da identificação de grupos farmacofóricos (Barreiro *et al.*, 1997; Rocha; Sant'Anna, 2024). Assim, exclui ou atesta hipóteses de mecanismo de ação a nível eletrônico e molecular, a fim de planejar fármacos mais seletivos, potentes e seguros para a população.

4.3.1.1 Ancoramento molecular

Molecular Docking, Ancoragem ou Ancoramento Molecular, é um método que possibilita a predição da conformação de uma macromolécula ao ser associada a uma outra molécula por meio de forças intermoleculares e do cálculo (Forli *et al.*, 2016). É amplamente usada na pesquisa de novas substâncias terapêuticas devido ao seu fundamento na modelagem molecular, e pode ser classificada em ancoramento molecular rígido, flexível ou semi flexível, com base na relação do ligante e do receptor (Meng *et al.*, 2011).

No ancoramento rígido, é considerado que tanto o ligante quanto o receptor são inflexíveis, ou seja, durante a interação não há mudança de conformação de ambos. Com isso, são computados apenas três ângulos livres translacionais e três de rotação, e este não é um modelo usado em pesquisas atualmente devido aos resultados imprecisos (Meng *et al.*, 2011). O ancoramento do tipo semi-flexível considera, geralmente, o ligante como flexível e o receptor como rígido, e possui resultados melhores que o ancoramento rígido, o que o torna eficiente, principalmente, na triagem virtual de um número elevado de estruturas de uma única vez (Mohanty; Mohanty, 2023). Na ancoragem flexível, ambos são considerados flexíveis, o que resulta em alterações conformacionais em ambas as partes, mas que demanda maior tempo de processamento (Meng *et al.*, 2011).

Cada *software* atua de acordo com um tipo de ancoragem molecular, quanto mais tecnologia envolvida e técnica, maior será o custo do programa a ser utilizado. Por isso, adequar a metodologia aos objetivos de cada estudo a ser realizado, é a etapa inicial para garantir resultados de forma eficiente e prática.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As estruturas das cisteínas-proteases foram obtidas por meio do banco de dados RCSB *Protein Data Bank* (Burley *et al.*, 2025). O critério de escolha de estruturas com menos de 2,00 Å de resolução, o que indica uma melhor qualidade do modelo tridimensional. Os códigos correspondentes às proteínas selecionados foram 2XU1 (Catepsina L) (Hardegger *et al.*, 2011) e 8B4T (Catepsina B) (Rubesova; Guetschow; Mares, 2022), correspondendo aos valores de resolução 1,45 Å e 1,45 Å, respectivamente. As estruturas das proteínas, em suas formas tridimensionais, foram tratadas através do *software* AutoDock Tools, versão 1.5.6, seguindo o protocolo estabelecido por Forli e colaboradores (2016). As principais modificações feitas nos modelos foram: retirada de moléculas de solvente, adição de átomos de hidrogênio, checagem por átomos ausentes e cálculo das cargas parciais de Kollman. Então, o arquivo de cada alvo molecular devidamente preparado foram salvos em formato .pdbqt.

Para fins de comparação com os compostos testes, cada ligante de referência, NT ((2S,4R)-1-[1-(4-chlorophenyl)cyclopropyl]carbonyl-4-(2-chlorophenyl)sulfonyl-N-[1-(imino methyl)cyclopropyl]pyrrolidine-2-carboxamide), complexado com a enzima Catepsina L, e CB((2S)-2-[[[(2S)-2-[(4-chloranylphenoxy)carbonylamino]-3-cyclohexyl-propanoyl]amino]-3-phenyl-propanoic acid), complexado com a enzima Catepsina B, foram otimizados através do *software* AutoDock Tools, e salvos no formato .pdbqt para realização do *docking*.

O sítio ativo ou *grid box* foi definido também por meio do programa AutoDock Tools, resultando em uma região na qual se encontra o ligante de referência, sendo esta representada por coordenadas que foram alteradas para uma melhor conformação e leitura. Para a enzima Catepsina L, foi estabelecido um *grid box* com coordenadas $x = 30.386$, $y = -25.687$ e $z = -10.184$, e para o modelo da enzima Catepsina B, um *grid box* com coordenadas $x = 9.032$, $y = 3.933$ e $z = -17.250$.

Os 9 compostos derivados de flavonóides (EMF-12A, EMF-12B e EMF-12C) e chalconas (EM1A, EM1B, EM1C, EM2A, EM2B e EM2C), foram obtidos do estudo *in vitro* realizado pelo Doutor Luan dos Santos Vianna e pelo Prof Dr. Wagner Júdice (sob sigilo), e desenhados com o auxílio do programa *ChemSketch*, versão 2023.1.2, por meio do qual as ligações foram otimizadas, utilizando a função *3D optimization*, e as estruturas salvas em coordenadas tridimensionais no formato de arquivo .mol. Posteriormente transformadas para o formato de arquivo .pdbqt por meio do *software* Pymol, versão 3.1.3.1.

O *Molecular Docking* foi realizado sob a abordagem rígido-flexível com solvente implícito no programa AutoDock Vina, versão 1.1.2 (Eberhardt *et al.*, 2021). Primeiro, foi realizado o reancoramento entre cada alvo molecular e seu ligante referência para validação do teste, determinação das ligações obtidas experimentalmente e o valor de *seed*, garantindo a reprodutibilidade do experimento (Mateev *et al.*, 2022). O Ancoramento Molecular resultou em um *seed* de 2077148828 para Catepsina L e para a Catepsina B de -148306860, esses valores foram utilizados como parâmetros para realização do *docking* das Catepsina L e B com os compostos testes. Para melhor visualização foram analisados os resultados em formato 3D das interações previstas, por meio do *software BIOVIA Discovery Studio Visualizer*, versão 25.1.0.24284 (Baroroh *et al.*, 2023).

Além desses processos, foram previstas propriedades físico-químicas dos ligantes em estudo para discussão de parâmetros farmacocinéticos e para o enriquecimento dos resultados. Por meio da plataforma ADMETlab 3.0, foram analisados a massa molecular (g/mol), o número de aceptores e doadores de Hidrogênio, o coeficiente de partição (LogP), e o número de violações às regras de Lipinski de cada composto em estudo (Fu *et al.*, 2024).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CATEPSINA L

Nas condições definidas anteriormente, foi prevista uma afinidade de -6,8 kcal/mol e um maior número de interações semelhantes às observadas no modelo de origem para o composto de referência (NT) frente ao modelo da enzima Catepsina L (de código PDB 2XU1). Abaixo estão os resultados obtidos (Tabela 1 e Figura 14) por meio da técnica, do ligante de referência em primeiro lugar para fins de análise comparativa e dos compostos-teste frente ao modelo tridimensional da enzima:

Tabela 1 - Valores de afinidade (kcal/mol), interações por ligação de Hidrogênio e hidrofóbicas previstas entre cada ligante frente ao modelo da enzima Catepsina L

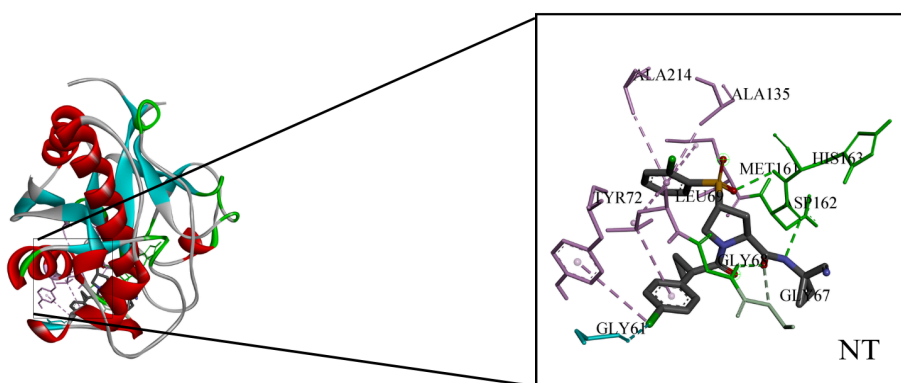
Composto	Afinidade (kcal/mol)	Interações por ligação de H	Interações hidrofóbicas	Outras interações
NT	-6,8	ASP162, GLY68 e HIS163	TYR72, LEU69, ALA135, ALA214 e MET161 (π -alquil)	GLY67 (H-C) e GLY61 (Halogênio)
EM-1A	-5,7	-	CYS25 (alquil); ALA135 (π -Alquil) e MET70 (Alquil)	MET70 (π -Enxofre); ALA214 e LEU69 (π - σ)
EM-1B	-6,8	-	ALA135 e MET70 (Alquil)	MET70 (π -Enxofre); ALA214 e LEU69 (π - σ)
EM-1C	-6,2	-	CYS25 e MET70 (Alquil); ALA135 e MET70 (π -alquil); MET161 (Amida- π -stacked)	LEU69 e ALA214 (π - σ); ASP162 (Van der Waals)
EM-2A	-5,8	MET161	ALA135 (π -alquil) LEU69 (Alquil)	CYS25 e MET70 (π -Enxofre); LEU69 e ALA214 (π - σ)
EM-2B	-6,5	-	ALA135, ALA214 e MET70 (π -alquil)	MET70 e CYS25 (π -Enxofre); LEU69

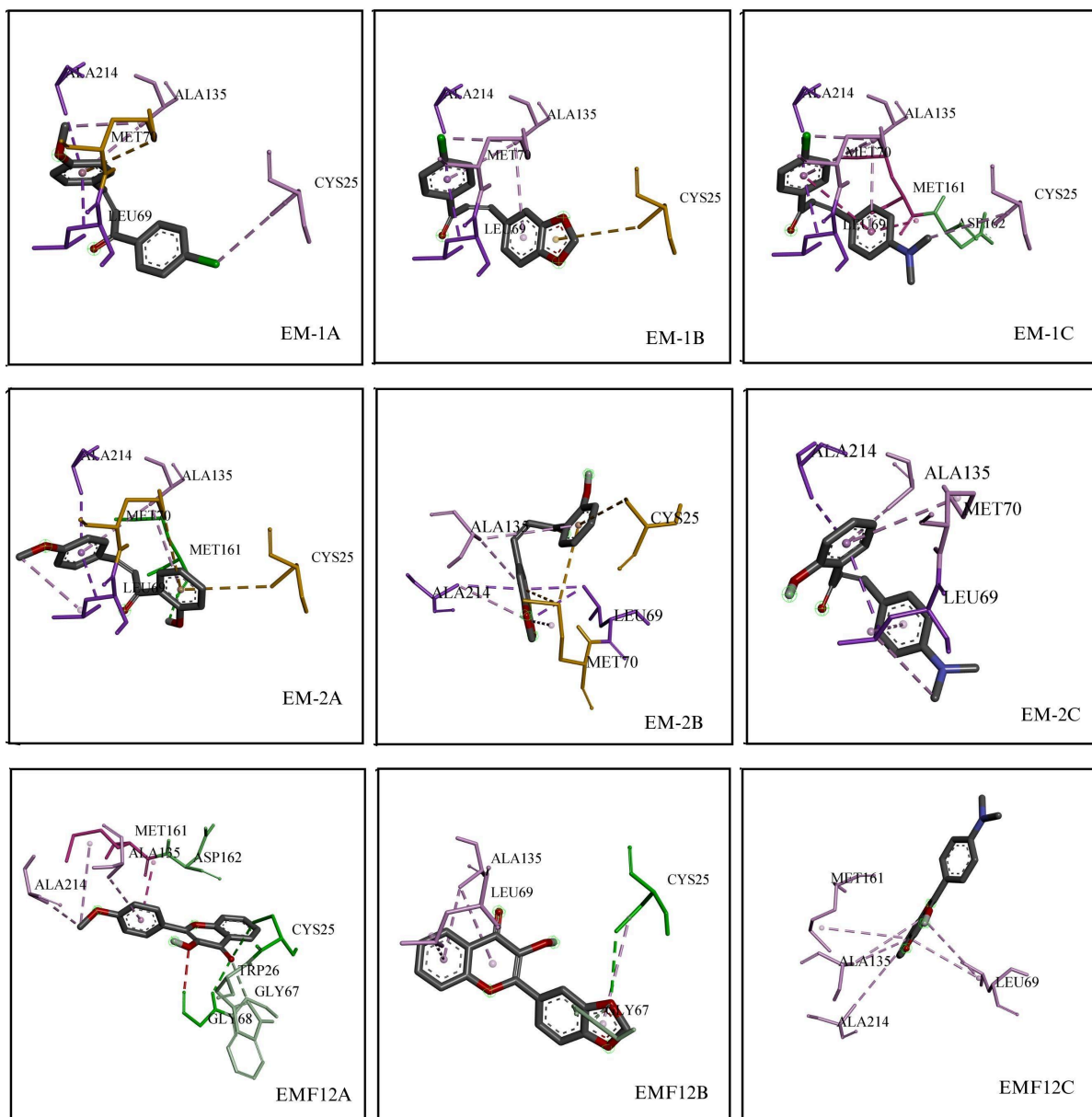
Composto	Afinidade (kcal/mol)	Interações por ligação de H	Interações hidrofóbicas	Outras interações
				e ALA135 (π - σ)
EM-2C	-5,7	-	LEU69 (Alquil); LEU69, ALA135 e MET70 (π -alquil)	LEU69 e ALA214 (π - σ)
EMF-12A	-5,7	CYS25 e GLY68	ALA214 e MET161 (π -alquil); GLY68 e MET161 (Amida- π -stacked)	GLY67 e TRP26 (H-C); ASP162 (Van der Waals)
EMF-12B	-6,7	CYS25	CYS25, ALA135 e LEU69 (π -alquil)	GLY67 (H-C)
EMF-12C	-6,2	-	LEU69, MET161, ALA135 e ALA214 (π -alquil);	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A seguir podem ser visualizadas as representações tridimensionais de cada ligante da classe de chalconas e flavonóides frente à enzima Catepsina L (PBD 2XU1):

Figura 14 - Visualização tridimensional das melhores poses e respectivas interações dos ligantes frente ao modelo da enzima Catepsina L (PBD 2XU1)





Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: Em verde estão representadas interações por ligação de Hidrogênio; em rosa-claro, interações hidrofóbicas; em rosa-escuro, interações Amida- π *stacking*; em laranja, interações atrativas; em verde-claro, interações de Van Der Waals; em cinza, interações por ligação de Hidrogênio não clássicas com Carbono; em azul, interação por ligação de Halogênio; e em vermelho, interações desfavoráveis.

Foram previstas algumas propriedades físico-químicas dos compostos por meio da plataforma ADMETlab 3.0 (Fu *et al.*, 2024).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas previstas para os compostos por meio da plataforma ADMETlab 3.0:

Composto	Massa Molecular (g/mol)	Aceptores de H	Doadores de H	LogP	Violações às Regras de Lipinski
NT	533,09	7	2	3,208	1
EM-1A	283,12	4	1	2,573	0
EM-1B	282,05	5	1	3,564	0
EM-1C	268,07	4	1	3,625	0
EM-2A	267,13	3	1	3,848	0
EM-2B	268,07	4	1	3,621	0
EM-2C	254,09	3	1	3,692	0
EMF-12A	285,09	2	0	4,309	0
EMF-12B	286,04	3	0	3,912	0
EMF-12C	272,06	2	0	4,010	0

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os resultados obtidos (Tabela 1 e Figura 14) para os compostos-teste, por meio da técnica *Molecular Docking*, sob abordagem rígido-flexível e solvente implícito, resultaram em valores de afinidade variados em relação ao ligante de referência (NT). Dentre os compostos-testes, destacaram-se os compostos EM-1C, EM-2B, EMF-12B e EMF-12C, que demonstraram valores energéticos favoráveis em relação ao observado para o ligante de referência, enquanto o composto EM-1B gerou o mesmo valor de afinidade (-6,8 kcal/mol). Portanto, por meio da análise dos resultados encontrados, foram atribuídas possíveis explicações com base na estrutura química, propriedades físico-químicas e interações intermoleculares previstas:

Em relação aos resultados obtidos na triagem enzimática *in vitro*, o composto-teste EM-1A apresentou maior capacidade inibitória frente a catepsina L, entretanto apresenta um valor de afinidade de -5,7 kcal/mol, sendo um valor desfavorável em relação aos demais compostos.

Dentre os candidatos citados, apenas o EM-1B não apresentou interações similares às do ligante de referência, embora seu valor de afinidade possa ser explicado pelo número de

doadores de hidrogênio próximo ao do NT. A substância EM-1A, com maior capacidade inibitória, possui o átomo de Cloro na posição *para* e um éter terminal, e faz apenas a interação com o resíduo ALA135 semelhante ao ligante de referência. O protótipo EMF-12B apresentou bons resultados *in silico* e *in vitro*, sendo um promissor candidato para futuros testes.

Em relação às propriedades físico-químicas (Tabela 2), é possível observar ainda que o ligante de referência (NT) possui uma massa molecular elevada em relação aos compostos-teste e, portanto, uma violação às regras de Lipinski. Para os compostos-teste, todos possuem perfil favorável nesta avaliação.

Dessa forma é possível supor que possuir elementos da família 7A e grupamentos com átomos de Oxigênio na estrutura são características importantes para a inibição enzimática. É importante ressaltar que o *software* AutoDock Vina apresenta um desvio-padrão de $\pm 3,0$ kcal/mol, portanto todos os compostos-testes apresentados estão estatisticamente dentro da faixa de desvio-padrão do ligante referência (-6,8 kcal/mol), e podem ser considerados semelhantes em relação à função *score* calculada.

6.2 CATEPSINA B

Nas condições definidas anteriormente, foi prevista uma afinidade de -6,6 kcal/mol e um maior número de interações semelhantes às observadas no modelo de origem para o composto de referência carbamato (CB) frente ao modelo da enzima Catepsina B (código PDB 8B4T). Abaixo estão os resultados obtidos (Tabela 3 e Figura 15) por meio da técnica, do ligante de referência em primeiro lugar para fins de análise comparativa e dos compostos-teste frente ao modelo tridimensional da enzima:

Tabela 3 - Valores de afinidade (kcal/mol), interações por ligação de Hidrogênio e hidrofóbicas previstas entre cada ligante frente ao modelo da enzima Catepsina B

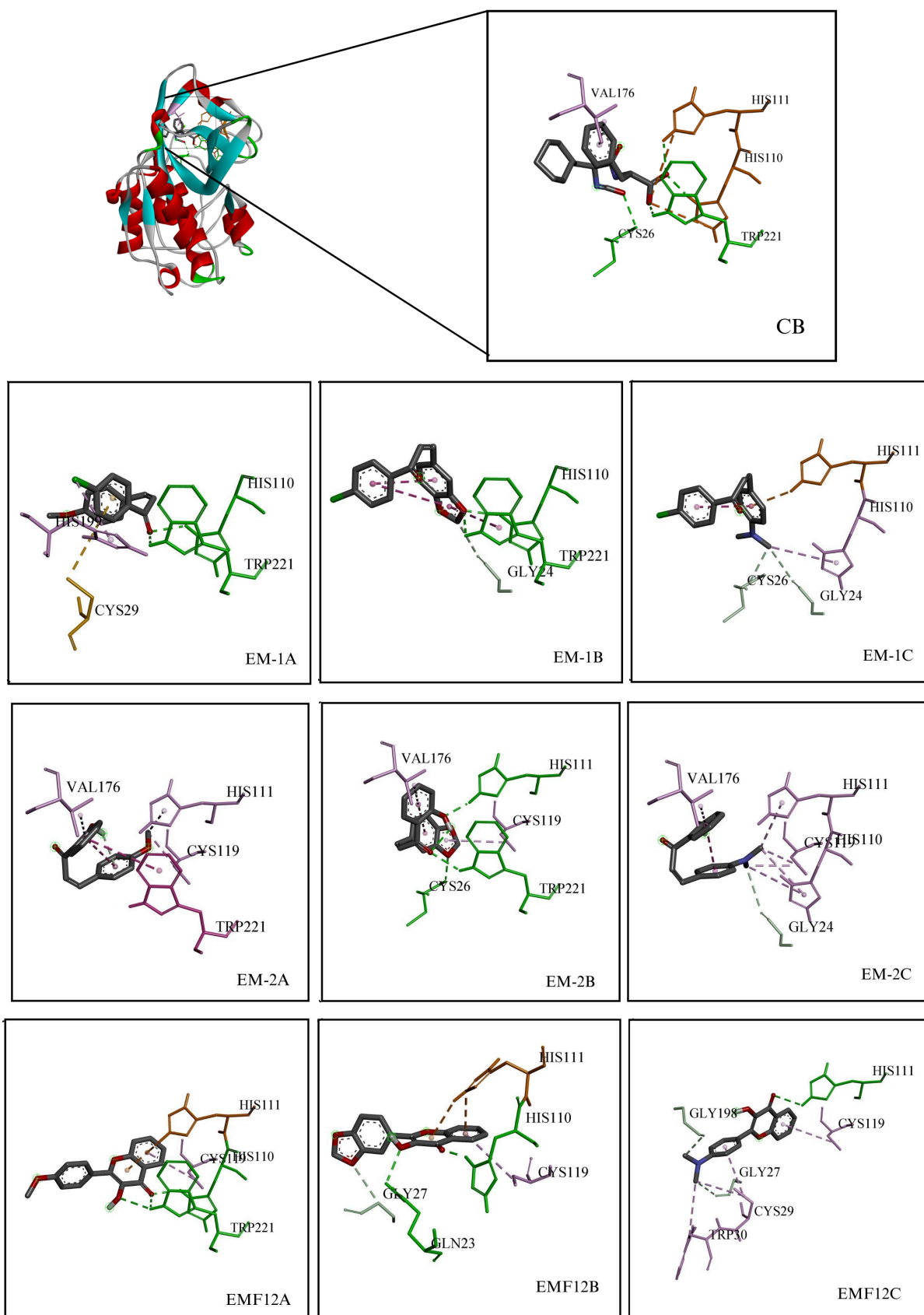
Composto	Afinidade (kcal/mol)	Interações por ligação de H	Interações hidrofóbicas	Outras interações
CB	-6,6	CYS25, TRP221, HIS 110 e HIS111	VAL176 (π -alquil)	HIS110 e HIS11 (Cargas atrativas)
EM-1A	-6,0	HIS110 e	HIS199 (π -alquil)	CYS29 (π -Enxofre)

Composto	Afinidade (kcal/mol)	Interações por ligação de H	Interações hidrofóbicas	Outras interações
		TRP221		
EM-1B	-6,4	HIS110 e TRP221	TRP221 (π - π stacked)	GLY24 (H-C)
EM-1C	-6,1	-	HIS110 (π -alquil)	GLY24 e CYS26 (H-C); HIS111 (π -Cátion)
EM-2A	-6,2	-	VAL176 (π -alquil); HIS111, VAL176 e CYS119 (Alquil)	TRP221 (π - π T-shaped)
EM-2B	-6,9	CYS26, HIS111 e TRP221	VAL176 e CYS119 (π -alquil);	-
EM-2C	-6,2	-	HIS111, HIS110 e CYS119 (Alquil); VAL176 (π -alquil);	GLY24 (H-C);
EMF-12A	-6,2	TRP221 e HIS110	CYS119 (π -alquil)	HIS111 (π -Cátion)
EMF-12B	-6,8	HIS110 e GLN23	CYS119 (π -alquil)	HIS111 (π -Cátion); GLY27 (H-C)
EMF-12C	-5,0	HIS111	CYS29 e CYS119 (π -alquil); TRP30 e CYS29 (Alquil)	GLY27 e GLY198 (H-C)

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A seguir podem ser visualizadas as representações tridimensionais de cada ligante da classe de chalconas e flavonóides frente à enzima Catepsina B (PBD 8B4T):

Figura 15 - Visualização tridimensional das melhores poses e respectivas interações dos ligantes frente ao modelo da enzima Catepsina B (PBD 8B4T)



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

Legenda: Em verde estão representadas interações por ligação de Hidrogênio; em rosa-claro, interações hidrofóbicas; em rosa-escuro, interações Amida- π *stacking*; em laranja, interações atrativas; em verde-claro, interações de Van Der Waals em cinza, interações por ligação de Hidrogênio não clássicas com Carbono; em

azul, interação por ligação de Halogênio; e em vermelho, interações desfavoráveis.

Foram previstas algumas propriedades físico-químicas dos compostos por meio da plataforma ADMETlab 3.0 (Fu *et al.*, 2024).

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas previstas para os compostos por meio da plataforma ADMETlab 3.0

Composto	Massa Molecular (g/mol)	Aceptores de H	Doadores de H	LogP	Violações às Regras de Lipinski
CB	472,18	7	3	3,889	0
EM-1A	283,12	4	1	2,573	0
EM-1B	282,05	5	1	3,564	0
EM-1C	268,07	4	1	3,625	0
EM-2A	267,13	3	1	3,848	0
EM-2B	268,07	4	1	3,621	0
EM-2C	254,09	3	1	3,692	0
EMF-12A	285,09	2	0	4,309	0
EMF-12B	286,04	3	0	3,912	0
EMF-12C	272,06	2	0	4,010	0

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os resultados obtidos para os compostos-teste (Tabela 3 e Figura 15) compreendem valores de afinidade variados em relação ao ligante de referência (CB). Dentre os compostos-testes, apenas o EMF-12C apresentou o valor mais distante, e os candidatos EM-2B e EMF-12B apresentaram valores de energia inferiores, e melhores que o composto de referência. Portanto, por meio da análise dos resultados encontrados, também foram atribuídas possíveis explicações com base na estrutura química, propriedades físico-químicas e interações intermoleculares previstas.

Em relação aos resultados obtidos na triagem enzimática *in vitro*, o composto-teste EMF-12B apresentou maior potencial inibitório frente a catepsina B, conseqüentemente o menor valor de IC₅₀, alinhando com o teste *in silico*, que gerou um valor energético de -6,8 kcal/mol, melhor que o observado para o ligante de referência.

O EM-2B apresentou o melhor valor de afinidade $-6,9$ kcal/mol, o que pode ser explicado pelas interações por ligação de Hidrogênio realizadas com os resíduos HIS111 e TRP221, semelhante ao ligante CB. No estudo realizado *in vitro*, este composto apresentou o segundo maior potencial inibitório, o que também é evidenciado por meio das interações intermoleculares observadas.

Ambos os compostos, EM-2B e EMF-12B, são semelhantes estruturalmente, pois possuem o mesmo grupo 1,3 dioxolano. Do ponto de vista físico-químico (Tabela 4), o composto EM-2B possui um grupamento doador e aceptor de hidrogênio a mais que o composto EMF-12B, o que pode justificar sua maior estabilidade nos testes realizados.

Portanto, os compostos-testes EM-2B e EMF-12B destacaram-se na inibição da catepsina B, estabelecendo um alinhamento dos estudos *in silico* e *in vitro*. Assim como discutido anteriormente para os testes realizados com a Catepsina L, todos os compostos-testes estão estatisticamente dentro da faixa de desvio-padrão do ligante referência ($-6,6$ kcal/mol), e podem ser considerados semelhantes em relação à função *score* calculada.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho, conduzido por meio da técnica de *Molecular Docking*, respalda o estudo *in vitro* de protótipos promissores para inibição das Catepsinas B e L, devido a visualização de interações intermoleculares relevantes junto às propriedades físico-químicas analisadas. Como compostos mais promissores, destacaram-se os candidatos EM-1B e EMF-12B frente à Catepsina L, e os candidatos EM-2B e EMF-12B frente à Catepsina B. Na avaliação da função *score* e interações intermoleculares, estes candidatos a protótipos apresentaram os melhores perfis de inibição por meio da técnica *in silico*. Assim, o alinhamento dos resultados permite a discussão acerca de um possível mecanismo de ação e a seleção dos melhores compostos para uma próxima bateria de testes e estudos.

REFERÊNCIAS

- ALMALKI, A. A. *et al.* Targeting cathepsin L in cancer management: leveraging machine learning, structure-based virtual screening, and molecular dynamics studies. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 24, p. 17208, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms242417208>. Acesso em: 20 abr. 2025.
- ARAÚJO, N. D. DE *et al.* A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. **Biology Studies**, v. 30, n. 70/72, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.7213/reb.v30i70/72.22819>. Acesso em: 25 abr. 2025.
- BAROROH, U. *et al.* Molecular interaction analysis and visualization of protein-ligand docking using Biovia Discovery Studio Visualizer. **Indonesian Journal of Computational Biology**, v. 2, p. 22-29, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.24198/ijcb.v2i1.46322>. Acesso em: 23 set. 2025.
- BARREIRO, E. J. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000300011>. Acesso em: 5 abr. 2025.
- BIASIZZO, M. *et al.* Cysteine cathepsins: a long and winding road towards clinics. **Molecular aspects of medicine**, v. 88, p. 101150, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101150>. Acesso em: 16 abr. 2025.
- BIOVIA Discovery Studio Visualizer**, Versão 2025; Dassault Systèmes, San Diego: Dassault Systèmes, 2023. Disponível em: <https://www.3ds.com/>.
- BURLEY, S. K. *et al.* Updated resources for exploring experimentally-determined PDB structures and Computed Structure Models at the RCSB Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 53, p. 563-565, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1091>. Acesso em 23 set. 2025.
- CAI, Z.; XU, S.; LIU, C. Cathepsin B in cardiovascular disease: underlying mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 28, n. 17, p. e70064, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcmm.70064>. Acesso em: 14 mar. 2025.
- CHATTERJEE, R.; LONES, M.; KALNITSKY, G. Histone degradation by lysosomal proteases. Em: TURK, V. (Ed.). **Cysteine Proteinases and their Inhibitors**. Berlin, Boston: De Gruyter, 1986. p. 97–110.
- COLONNA, M.; BUTOVSKY, O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. **Annual review of immunology**, v. 35, p. 441–468, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>. Acesso em: 18 mar. 2025.
- ChemSketch**, Versão 2023.1.2; Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), Toronto: ON, 2022. Disponível em: www.acdlabs.com.

DENG, T. *et al.* Cathepsins and cancer risk: a Mendelian randomization study. **Frontiers in endocrinology**, v. 15, p. 1428433, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1428433>. Acesso em: 3 abr. 2025.

EBERHARDT, J. *et al.* AutoDock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, p. 3891-3898, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>. Acesso em: 23 set. 2025.

FORLI, S. *et al.* Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nature protocols**, v. 11, n. 5, p. 905-919, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>. Acesso em: 23 jul. 2025.

FU, L. *et al.* ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. **Nucleic Acids Research**, v. 52, p. 423-429, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae236>. Acesso em: 23 set. 2025.

FUSETANI, N. *et al.* Tokaramide A, a new cathepsin B inhibitor from the marine sponge *Theonella aff. mirabilis*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 9, n. 24, p. 3397-3402, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00618-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00618-6). Acesso em: 2 abr. 2025.

HARDEGGER, L. A.; *et al.* Systematic Investigation of Halogen Bonding in Protein-Ligand Interactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 314-316, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201006781>. Acesso em: 25 jun. 2025.

HOOK, V. *et al.* Cathepsin B in neurodegeneration of Alzheimer's disease, traumatic brain injury, and related brain disorders. **Biochimica et biophysica Acta Proteins and proteomics**, v. 1868, n. 8, p. 140428, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140428>. Acesso em: 18 mar. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). ABC do câncer: **abordagens básicas para o controle do câncer**. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro INCA, 2011.

JENKO KOKALJ, S. *et al.* Essential role of proline isomerization in stefin B tetramer formation. **Journal of molecular biology**, v. 366, n. 5, p. 1569-1579, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.025>. Acesso em: 26 mar. 2025.

KIM, S. *et al.* PubChem 2025 update. **Nucleic Acids Res.**, v. 53, n. D1, p. D1516-D1525, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059>. Acesso em: 27 out. 2025.

KOS, J. *et al.* Cysteine Proteinase Inhibitors Stefin A, Stefin B, and Cystatin C in Sera from Patients with Colorectal Cancer: Relation to Prognosis1. **Clinical cancer re**, v. 6, n. 1 fev, p. 505-511, 2000.

KOS, J.; MITROVIĆ, A.; MIRKOVIĆ, B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1355-1371, 2014.

LAFARGE, J.-C.; CLÉMENT, K.; GUERRE-MILLO, M. Cathepsins S, L, and K and their pathophysiological relevance in obesity. **Clinical reviews in bone and mineral metabolism**, v. 9, n. 2, p. 133-137, 2011.

LOPES-BASTOS, B. M.; JIANG, W. G.; CAI, J. Tumour-endothelial cell communications: Important and indispensable mediators of tumour angiogenesis. **Anticancer research**, v. 36, n. 3, p. 1119–1126, 2016.

MATEEV, E. *et al.* Validation through re-docking, cross-docking and ligand enrichment in various well-resolved MAO-B receptors. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 13, n. 3, p. 1099-1106, 2022. Disponível em: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13\(3\).1099-07](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13(3).1099-07). Acesso em: 23 set. 2025.

MENDONSA, A. M.; GUMBINER, B. M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 35, p. 4769–4780, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2>. Acesso em: 19 mar. 2025.

MENG, X.-Y. *et al.* Molecular Docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>. Acesso em: 4 jun. 2025.

MIRKOVIĆ, B. *et al.* Regulation of cathepsin B activity by 2A2 monoclonal antibody. **The FEBS journal**, v. 276, n. 17, p. 4739–4751, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07171.x>. Acesso em: 13 abr. 2025.

MOHANTY, M.; MOHANTY, P. S. Molecular Docking in organic, inorganic, and hybrid systems: a tutorial review. **Monatshefte fur chemie**, p. 1–25, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00706-023-03076-1>. Acesso em: 26 abr. 2025.

NAKANISHI, H. Cathepsin regulation on microglial function. **Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 9, p. 140465, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140465>. Acesso em: 28 abr. 2025.

NAKANISHI, H. Microglial cathepsin B as a key driver of inflammatory brain diseases and brain aging. **Neural regeneration research**, v. 15, n. 1, p. 25–29, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264444>. Acesso em: 16 mar. 2025.

OLIVEIRA *et al.* Natural Bioactive Compounds: Promoting Agents in The Reduction of Oxidative Stress and Inflammatory Processes. **Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 5, p. 258–273, 2018. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/1643>. Acesso em: 23 set. 2025.

ORLIKOWSKA, M. *et al.* **Crystal structure of V57D mutant of human cystatin C**. Worldwide Protein Data Bank, , 1 ago. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb3sva/pdb>. Acesso em: 25 mar. 2025.

PAVLOVA, A.; BJÖRK, I. The role of the second binding loop of the cysteine protease inhibitor, cystatin A (stefin A), in stabilizing complexes with target proteases is exerted predominantly by Leu73: Second protease-binding loop of cystatin A. **European journal of biochemistry**, v. 269, n. 22, p. 5649–5658, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03273.x>. Acesso em: 24 mar. 2025.

POWERS, J. C. *et al.* Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4639–4750, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr010182v>. Acesso em: 27 mar. 2025.

The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 3.1; Schrödinger, New York: LLC, 2020. Disponível em: <https://www.pymol.org/>.

RAMALHO, S. D. *et al.* Evaluation of flavonols and derivatives as human cathepsin B inhibitor. **Natural product research**, v. 29, n. 23, p. 2212–2214, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1002404>. Acesso em: 21 mar. 2025.

ROCHA, V.; SANT'ANNA, C. From origin to current methods: an overview of molecular modeling applied to Medicinal Chemistry in the last 30 years. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35, n. 10, p. 3-7, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20240103>. Acesso em: 25 abr. 2025.

ROT, A. E. *et al.* Cysteine cathepsins: From diagnosis to targeted therapy of cancer. **Biochimie**, v. 226, p. 10–28, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.09.001>. Acesso em: 15 abr. 2025.

RUBESOVA, P.; GUETSCHOW, M.; MARES, M. Human cathepsin B in complex with the carbamate inhibitor 7. **Protein Data Bank**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2210/pdb8b4t/pdb>. Acesso em: 17 ago. 2025.

SALMINEN, A. Effects of the protease inhibitor leupeptin on proteolytic activities and regeneration of mouse skeletal muscles after exercise injuries. **The American Journal of Pathology**, v. 117, n. 1, p. 64–70, 1984. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1900567/>. Acesso em: 13 jun. 2025 .

SALMINEN, A.; GOTTESMAN, M. M. Inhibitor studies indicate that active cathepsin L is probably essential to its own processing in cultured fibroblasts. **The Biochemical journal**, v. 272, n. 1, p. 39–44, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj2720039>. Acesso em: 14 jun. 2025.

SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: an introduction. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20090007>. Acesso em: 15 jun. 2025.

SAYERS, W. E. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2025, **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D20–D29, 2025. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae979>. Acesso em: 23 set. 2025.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia**. Porto Alegre: ArtMed, 2017.

SOUSA, L. R. F. de *et al.* Natural products as inhibitors of recombinant cathepsin L of *Leishmania mexicana*. **Experimental parasitology**, v. 156, p. 42–48, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.016>. Acesso em: 16 mar. 2025.

SOUZA SPINELLI, A. C. de *et al.* Rigidez arterial: aplicações clínicas dos conceitos e métodos de avaliação. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 27, n. 1, p. 7–12, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.47870/1519-7522/202027017-12>. Acesso em: 21 mar. 2025.

STOKA, V. *et al.* The role of cysteine protease cathepsins B, H, C, and X/Z in neurodegenerative diseases and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 24,

n. 21, p. 15613, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms242115613>. Acesso em: 13 mar. 2025.

STOKA, V.; TURK, V.; TURK, B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. **Ageing research reviews**, v. 32, p. 22–37, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.04.010>. Acesso em: 13 mar. 2025.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Cell-matrix interactions: focus on proteoglycan-proteinase interplay and pharmacological targeting in cancer. **The FEBS journal**, v. 281, n. 22, p. 5023–5042, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/febs.12927>. Acesso em: 15 mar. 2025.

TURK, V. *et al.* Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1824, n. 1, p. 68–88, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>. Acesso em: 26 mar. 2025.

VIDAK, E. *et al.* Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. **Cells**, v. 8, n. 3, p. 264, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells8030264>. Acesso em: 8 mar. 2025.

VIDAL-ALBALAT, A.; GONZÁLEZ, F. V. Natural Products as Cathepsin Inhibitors. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 50, p. 179–213, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63749-9.00006-2>. Acesso em: 17 mar. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2025 data.who.int, Brazil [Country overview]. Acesso em 4 mar. 2025.

XIE, Z. *et al.* Cathepsin B in programmed cell death machinery: mechanisms of execution and regulatory pathways. **Cell death & disease**, v. 14, n. 4, p. 255, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05786-0>. Acesso em: 10 mar. 2025.

YADATI *et al.* The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. **Cells**. v. 9, n. 7, p. 1679, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9071679>. Acesso em: 14 mar. 2025.