

## Chalconas como inibidores da proteína tirosina fosfatase A (PtpA) de *Mycobacterium tuberculosis*.

Louise Domeneghini Chiaradia (PG)<sup>1,2\*</sup>, Priscila Graziela Alves Martins (PG)<sup>2</sup>, Marlon Norberto Sechini Cordeiro (PG)<sup>1</sup>, Javier Vernal (PQ)<sup>2</sup>, Rosendo Augusto Yunes (PQ)<sup>1</sup>, Ricardo José Nunes (PQ)<sup>1</sup>, Hernán Terenzi (PQ)<sup>2</sup>. \*louisedc@gmail.com

<sup>1</sup> LEAT, Depto Química, CFM-UFSC. <sup>2</sup> CEBIME, Depto Bioquímica, CCB-UFSC, 88040-900, Florianópolis - SC.

Palavras Chave: tuberculose, PtpA, fosfatases, chalconas.

### Introdução

A bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) provoca a tuberculose, uma doença grave, que tem se tornado um grande desafio para a saúde pública, devido ao surgimento de cepas multirresistentes. Anualmente são diagnosticados 10 milhões de novos casos, e cerca de 2 milhões de pessoas morrem em consequência da doença no mundo.<sup>1</sup>

A análise do genoma do Mtb revelou a presença de duas proteínas fosfotirosinas fosfatases de baixo peso molecular, PtpA e PtpB.<sup>2</sup> Foi demonstrado que a PtpA consegue atravessar a membrana celular do hospedeiro, e desfosforila a proteína citoplasmática VPS33B, inibindo a maturação de fagossomos, e conseqüentemente, impede a fusão destes com lisossomos, mecanismo pelo qual os macrófagos promovem sua atividade microbicida.<sup>3</sup> A inativação da PtpA também atenua o crescimento do Mtb em macrófagos humanos.<sup>3</sup> Portanto, a inibição da PtpA aparece como um novo alvo para a cura da tuberculose. Em recentes estudos, identificamos naftilchalconas como inibidores da PtpA de Mtb.<sup>4,5</sup>

Assim, o objetivo deste trabalho foi a avaliação do potencial inibitório de novas chalconas frente à PtpA de Mtb, a fim de obter resultados que contribuam para a análise da relação estrutura atividade dos inibidores desta enzima.

### Resultados e Discussão

Foram sintetizadas 120 chalconas,<sup>6</sup> através da condensação entre aldeídos e acetofenonas, em meio básico, metanol, agitação magnética e t.a. por 24h. Todos os compostos foram triados frente à enzima recombinante PtpA, em placas de ELISA de 96 poços, utilizando uma única concentração (25µM, diluídos em DMSO e água MilliQ). Adicionou-se 20mM de tampão imidazol pH 7, 40mM de substrato pNPP (*p*-nitrofenil-fosfato), 2µL de PtpA 1,0µg/µL (em tampão Tris 25mM pH 8 e DTT 40mM) e água MilliQ q.s.p. 198 µL. As absorbâncias foram obtidas a cada 1 min, durante 10 min, em leitor de placas de ELISA (TECAN), a 410 nm. Para os compostos que apresentaram inibição ≥ a 26%, foram realizados ensaios para determinação da IC<sub>50</sub>. Estudou-se o mecanismo de inibição das 3 chalconas mais

potentes como inibidores da PtpA (**R6**, **C12** e **P11**), seguindo a mesma metodologia usada para os testes de percentual de inibição e determinação da IC<sub>50</sub>, porém, variando as concentrações do substrato. Os resultados foram calculados pela média de 3 experimentos feitos em triplicata, tendo como controle positivo a ausência de chalconas (**Tabela 1**). Através de gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, verificou-se que os inibidores da PtpA atuam por mecanismo do tipo competitivo, com valores de K<sub>i</sub> entre 15 e 35 µM.

**Tabela 1.** IC<sub>50</sub> (µM) frente a PtpA, valores de K<sub>i</sub> e seletividade dos inibidores da PtpA.

Chalcona	IC <sub>50</sub> PtpA (µM)	K <sub>i</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> Ptp1B (µM)	IS
<b>R6</b>	15,1 ± 4,2	15	263,0 ± 3,0	17,42
<b>C12</b>	32,1 ± 4,0	30	100,0 ± 4,8	3,16
<b>P11</b>	44,7 ± 6,5	35	107,2 ± 2,4	2,40

IS = índice de seletividade

Para detectar a possível inibição cruzada dos compostos com outras tirosina-fosfatases, os inibidores da PtpA de Mtb foram ensaiados em uma PTP humana, a PTP1B. A diferença de ação inibitória para as duas enzimas (**Tabela 1**) sugere que estas chalconas apresentam diferentes graus de seletividade para a PtpA de Mtb, sendo **R6** considerada seletiva para esta enzima.

### Conclusões

Dentre 120 compostos sintetizados, 3 chalconas foram identificadas como inibidores competitivos da PtpA de Mtb, sendo **R6** seletiva para esta enzima.

### Agradecimentos

CNPq, CAPES e DQ-UFSC.

<sup>1</sup> Maher, D.; Raviglione, M. *Clin Chest Med*, **2005**, *26*, 167.

<sup>2</sup> Cole, S. T. *et al. Nature*, **1998**, *393*, 537-544.

<sup>3</sup> Bach, H. *et al. Cell Host & Microbe*, **2008**, *3*, 316-322.

<sup>4</sup> Chiaradia, L. D.; *et al. Bioorg Med Chem Lett*, **2008**, *18*, 6227-6230.

<sup>5</sup> Mascarello, A.; *et al. Bioorg Med Chem*, **2010**, *18*, 3783-3789.

<sup>6</sup> Chiaradia, L. D. *Tese de Doutorado*, PGQMC - UFSC, **2010**, 614p.