

## Novos inibidores competitivos da proteína tirosina fosfatase B (PtpB) 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](mailto: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, PtpB, fosfatases, chalconas.

### Introdução

A análise do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) revelou a presença de duas proteínas: PtpA e PtpB, fosfotirosinas fosfatases de baixo peso molecular.<sup>1</sup> Recentemente, estudos demonstraram que a PtpB destrói a resposta imune inata por bloquear a ERK1/2 e p-38 mediadas por IFN- $\gamma$  estimulado pela produção de IL-6, e promove a sobrevivência da célula do hospedeiro por ativar a via da Akt e bloquear a atividade da caspase-3.<sup>2</sup> Esse estudo demonstrou que a PtpB é essencial para a persistência bacteriana intracelular, sugerindo que a inativação dessa enzima reduz o crescimento da Mtb nos macrófagos humanos. Assim, a inibição da PtpB aparece como uma estratégia terapêutica promissora para a obtenção de fármacos anti-tuberculose.

Em estudos anteriores, identificamos chalconas, que são intermediários da biossíntese dos flavonóides nas plantas, como uma nova classe de inibidores da PtpA de Mtb.<sup>3,4</sup> Agora, nosso principal objetivo é a busca por inibidores seletivos da PtpB de Mtb.

### Resultados e Discussão

Foram sintetizadas 120 chalconas,<sup>5</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 PtpB, em placas de ELISA de 96 poços, utilizando uma única concentração (25 $\mu$ M, diluídos em DMSO e água MilliQ). Adicionou-se 20mM de tampão imidazol pH 7, 40mM de substrato pNPP (*p*-nitrofenil-fosfato), 2 $\mu$ L de PtpB 0,4 $\mu$ g/ $\mu$ L (em tampão Tris/HCl 20mM pH=8, NaCl 50mM, EDTA 5mM, glicerol 20% e DTT 5mM) e água MilliQ q.s.p. 198  $\mu$ L. As absorvâncias 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  $\geq$  a 30%, foram realizados ensaios para determinação da IC<sub>50</sub>.

Realizaram-se estudos cinéticos para as 3 chalconas mais potentes (**R32**, **C25** e **P4**), 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 ausência de chalconas (**Tabela 1**).

Através de gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, verificou-se que os inibidores da PtpB atuam por mecanismo do tipo competitivo, com valores de K<sub>i</sub> entre 8 e 13  $\mu$ M.

Os inibidores da PtpB foram ensaiados em uma PTP humana, a PTP1B, para detectar a possível inibição cruzada dos compostos com outras tirosina-fosfatases. A diferença de ação inibitória de **R32** para as duas enzimas sugere que esta chalcona é seletiva para a PtpB de Mtb. **C25** e **P4** não apresentam seletividade, tendo melhor ou igual atividade inibitória da PTP humana que da PTP da micobactéria, quando considerado o erro experimental (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) frente a PtpB, valores de K<sub>i</sub> e seletividade dos inibidores da PtpB.

Chalcona	IC <sub>50</sub> PtpA ( $\mu$ M)	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> Ptp1B ( $\mu$ M)	IS
<b>R32</b>	11,9 $\pm$ 1,6	8	3090,3 $\pm$ 168,0	259,69
<b>C25</b>	25,2 $\pm$ 6,0	12	28,8 $\pm$ 2,1	1,14
<b>P4</b>	51,4 $\pm$ 8,2	13	23,4 $\pm$ 2,4	0,46

IS = índice de seletividade

### Conclusões

Dentre 120 compostos sintetizados, identificou-se, pela primeira vez, 3 chalconas como inibidores competitivos da PtpB de Mtb, sendo **R32** seletiva para esta enzima. Serão realizados estudos de modelagem molecular para obter os modelos de interação do complexo enzima-inibidor.

### Agradecimentos

CNPq, CAPES e DQ-UFSC.

<sup>1</sup> Cole, S. T. *et al. Nature*, **1998**, 393, 537–544.

<sup>2</sup> Zhou, B.; *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, **2010**, 107 (10), 4573.

<sup>3</sup> Chiaradia, L. D.; *et al. Bioorg Med Chem Lett*, **2008**, 18, 6227–6230.

<sup>4</sup> Mascarello, A.; *et al. Bioorg Med Chem*, **2010**, 18, 3783–3789.

<sup>5</sup> Chiaradia, L. D. *Tese de Doutorado*, PGQMC - UFSC, **2010**, 614p.