

# CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES PARA A PROTEASE DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA (FMDV - FOOT AND MOUTH DISEASE VÍRUS) Lb<sup>pro</sup>

Gabriel Domingues dos Santos<sup>1</sup>, Alyne Alexandrino Antunes<sup>2</sup>, Daniel Moreno Garcia<sup>2</sup>, Luiz Juliano<sup>3</sup>, Jorge Alexandre Nogueira Santos<sup>4</sup>,  
Wagner Alves de Souza Júdice<sup>5</sup>

Estudante do Curso de Medicina da UMC; e-mail: gabrieldomingues182@yahoo.com.br<sup>1</sup>

Mestre pelo programa Biotecnologia da UMC; aline-alexandrino@hotmail.com<sup>2</sup>

Mestre pelo programa Biotecnologia da UMC; danielm-g@hotmail.com<sup>2</sup>

Professor-pesquisador da UNIFESP; ljuliano@terra.com.br<sup>3</sup>

Professor-pesquisador da UMC; wagneras@umc.br<sup>4</sup>

**Área de conhecimento:** Enzimologia

**Palavras- chave:** Cisteíno-proteases, Inibidores, Ciclopaladados, Lb<sup>pro</sup>, Febre Aftosa

## INTRODUÇÃO

Cisteíno-proteases desempenham importante papel no metabolismo protéico celular, no processamento de pró-hormônios e pró-enzimas, e na degradação de proteínas da matriz extracelular e estão envolvidas em muitas patologias (II et al., 1993). Membro da família das cisteíno-proteases, a Lb<sup>pro</sup> do vírus da febre aftosa (FMDV) está envolvida na clivagem do fator de iniciação eucariótica do hospedeiro (eIF4), GI e 4GII, facilitando a tradução viral e diminuindo a síntese de  $\gamma$ -Interferon favorecendo a replicação viral (GUARNÉ et al., 1998; SKERN et al., 1998). Pelo envolvimento em processos patológicos, as cisteíno-proteases são alvos no desenvolvimento de inibidores dentre eles a classe dos ciclopaladados. Os ciclopaladados são substâncias com propriedades de reação na ligação paládio-carbono e em estudos apresentaram atividade antitumoral e antiparasitária (CAIRES & MAURO, 1995; RODRIGUES et al., 2003). Em função da capacidade de inibição de cisteíno-proteases como as catepsinas lisossomais (CAIRES & MAURO, 1995), os ciclopaladados tornam-se moléculas promissoras no desenvolvimento de drogas antivirais em especial a Lb<sup>pro</sup> do FMDV.

## OBJETIVOS

O presente projeto de iniciação científica tem por objetivo o estudo da cisteíno-protease do vírus da febre aftosa Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) frente a possíveis moléculas inibidoras de uma família de ciclopaladados apresentando variações nos agentes de ciclometalação.

## METODOLOGIA

Os ensaios cinéticos da Lb<sup>pro</sup> foi realizado em tampão borato/borax 50mM, pH 7,8. Alíquotas da enzima foi pré-incubada com DTT 2.5mM durante 5min a 35°C. Suas hidrólises foram seguidas pela medição da fluorescência (substrato Abz-KVQRKLLKGAGQ-EDDnp  $\rightarrow$   $\lambda_{ex}$ =320nm e  $\lambda_{em}$ =420nm) em espectrofluorímetro Hitachi F2500. Os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não linear usando o programa Garfic 5.0. Os ensaios de inibição da Lb<sup>pro</sup> foram similares aos ensaios de hidrólise do substrato nos quais se procedeu a adição de concentrações crescentes de inibidor até a estabilização da queda da atividade enzimática. Com os

dados adquiridos calculou-se os valores de IC<sub>50</sub>s e a determinação do mecanismo de inibição foi realizada de acordo com plote de Michaelis-Menten e plote de Lineweaver-Burk conjuntamente com os replotes das inclinações e interceptos.

## MATERIAIS / INSTRUMENTOS

A construção do plasmídeo foi realizado pelo prof. Tim Skern do Max F. Perutz do Laboratório do Departamento de Bioquímica Médica, Universidade de Vienna, Áustria. A enzima foi expressa e purificada de acordo (KIRCHWEGER et al., 1994; GUARNÉ et al., 2000) e gentilmente cedida pelo Dr. Jorge Alexandre Nogueira Santos do Departamento de Biofísica da UNIFESP. O substrato Abz-KVQRKCLKGAGQ-EDDnp foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Maria Aparecida Juliano da UNIFESP e sua concentração determinada em função da massa molar e volume de solução preparada. Foram utilizados 31 compostos ciclopilados nomeados por letras e números (uso interno do laboratório). Os compostos foram classificados em função de seu agente de ciclometalação e divididos nos grupos A (dmpa), B (N-benzil-N-metiletanolamina), C (N-benzil-2-nitroimidazol-acetamida), D (Cl-PyPheEt) e E (dmba), e em cada grupo os ciclopilados diferenciavam-se em compostos moleculares e iônicos.

## RESULTADOS

Os 31 compostos analisados (tabela 1) mostram que o ciclopilado 35(B) possuindo o agente de ciclometalação Cl-PyPheEt na forma de complexo molecular, apresentou a melhor atividade inibitória (IC<sub>50</sub>=0,012±0,003µM). O segundo melhor ciclopilado denominado 14(B), também molecular e com mesmo agente de ciclometalação, mostrou um IC<sub>50</sub>=0,024±0,001µM. Em geral os ciclopilados foram bons inibidores da Lb<sup>pro</sup> com valores de IC<sub>50</sub>s abaixo de 1µM. Entretanto, quatro compostos SF12, RcPd, 01(A) e 10(A) (tabela 1) foram os que tiveram menor eficiência inibitória com valores de 2,91µM; 2,08µM; 2,4µM; 2,35µM, respectivamente.

A análise do mecanismo de ação do composto 70(A), através do plote Lineweaver-Burk e dos replotes das inclinações e interceptos (Figura 1), mostraram que este composto apresenta uma inibição reversível da Lb<sup>pro</sup> como observada no mecanismo inibitório proposto na Figura 2.

## CONCLUSÕES

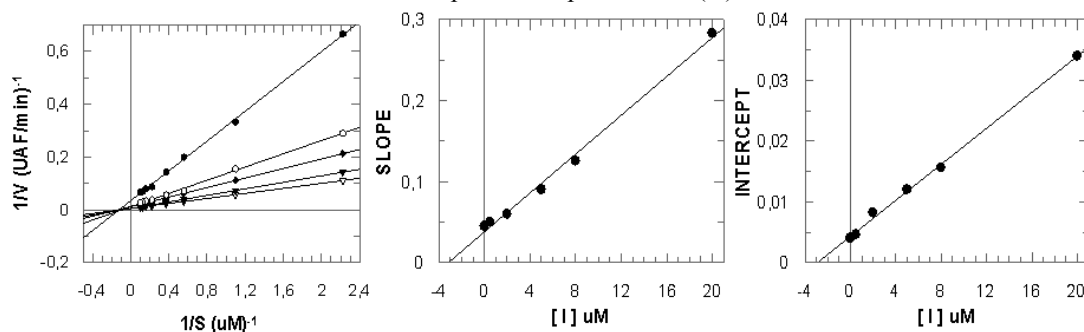
Em função dos resultados obtidos, verificados que os compostos ciclometalados com paládio são promissoras moléculas no desenvolvimento de novos fármacos tanto para a febre aftosa que representa um grande problema econômico para a pecuária brasileira, além desse estudo poder ser utilizado como ferramenta indireta no estudo de outras proteases de picornavirus incluindo o poliovírus, vírus da hepatite A, rinovírus e vírus da encefalomiocardite cujas cisteíno proteases apresentam grande similaridade estrutural com a Lb<sup>pro</sup>.

**Tabela 1)** Valores de IC<sub>50</sub> e as Variações dos Compostos Ciclopilados, conforme seu grupo, frente a Enzima Lb<sup>pro</sup>

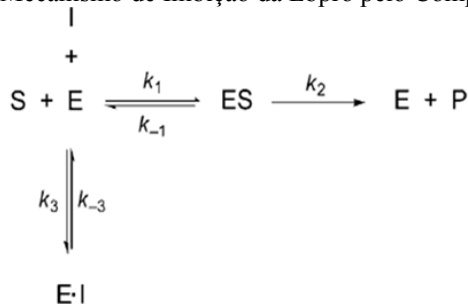
<b>Inibição Lb<sup>pro</sup></b>			
<b>Grupo A</b>	<b>IC<sub>50</sub>µM</b>	<b>Grupo C</b>	<b>IC<sub>50</sub> µM</b>
SE11	0,19 ± 0,01	RcPd-E11	0,76 ± 0,04
RE11	0,15 ± 0,01	RcPd-E12	0,17 ± 0,01
44(A)	0,28 ± 0,02	RcPd-F11	0,19 ± 0,01
SE12	0,23 ± 0,01	RcPd-F12	0,17 ± 0,01

RE12	$0,31 \pm 0,02$	RcPd	$2,08 \pm 0,21$
45(A)	$0,40 \pm 0,03$		
70(A)	$0,10 \pm 0,01$	<b>Grupo D</b>	<b>IC50 <math>\mu\text{M}</math></b>
SF11	$0,77 \pm 0,03$	14(B)	$0,024 \pm 0,001$
RF11	$0,44 \pm 0,02$	35(B)	$0,012 \pm 0,001$
SF12	$2,91 \pm 0,14$	15(B)	$0,40 \pm 0,01$
RF12	$1,2 \pm 0,07$	36(B)	$0,056 \pm 0,003$
<b>Grupo B</b>	<b>IC50 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Grupo E</b>	<b>IC50 <math>\mu\text{M}</math></b>
D2E11	$0,41 \pm 0,01$	01(A)	$2,40 \pm 0,13$
D2E12	$0,56 \pm 0,01$	12(A)	$0,50 \pm 0,04$
D2F11	$0,45 \pm 0,02$	03(A)	$0,51 \pm 0,02$
D2F12	$0,54 \pm 0,03$	13(A)	$0,29 \pm 0,01$
D2	$0,42 \pm 0,02$	10(A)	$2,35 \pm 0,14$
D2L	$0,46 \pm 0,02$		

**Figura 1)** Plote Lineweaver-Burk e replotes das inclinações e interceptos da inibição da Lbpro pelo composto ciclopaldado 70(A).



**Figura 2)** Mecanismo de Inibição da Lbpro pelo Composto 70(A)



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAIRES, A. C. F.; MAURO, A. E. (1996). *Química Nova*, v.19, n.1, p. 51

GUARNE, A.; Hampoelz, B.; Glaser, W.; X. Carpena, J. Tormo, I. Fita, T. Skern. *J. Mol. Biol.*, 302 (2000), pp. 1227–1240

GUARNE, A.; Tormo, J., Kirchweger, K., Pfistermueller, D., Fita, I. & Skern, T. (1998). *EMBO J.* 17, 7469-7479..

II, K.; ITO, H.; KOMINAMI, E.; HIRANO, A. (1993) *Virchows Arch A* 423: (3) 185-194.

KIRCHWEGER, R.; Ziegler, E; Lamphear, B.J; D. Waters, H.D. Liebig, W. Sommergruber, F. Sobrino, C. Hohenadl, D. Blaas, R.E. Rhoads, T.J. Skern. **J. Virol.**, 68 (1994), pp. 5677–5684

RODRIGUES, E. G.; SILVA, L. S.; FAUSTO, D. M.; HAYASHI, M. S.; DREHER, S.; SANTOS, E. L.; PESQUERO, J. B.; CAIRES, A .C. F.; TRAVASSOS, L. R. R. G. (2003). **International Journal of Câncer**, v. 107, n. 3, p. 498-504.

SKERN, T., FITA, I. & GUARNE, A. (1998). **J. Gen. Virol.** 79, 301-307.

ZOTTIS, A. São Paulo, 2009. (Dissertação) Universidade de São Paulo.