

Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

XIV Semana Integrada do Instituto de
Física de São Carlos

Livro de Resumos da Pós-Graduação

São Carlos
2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Informação do IFSC

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos
(13: 21-25 ago.: 2023: São Carlos, SP.)

Livro de resumos da XIII Semana Integrada do Instituto de
Física de São Carlos – Universidade de São Paulo / Organizado
por Adonai Hilário da Silva [et al.]. São Carlos: IFSC, 2023.
358p.

Texto em português.

1.Física. I. Silva, Adonai Hilário da, org. II. Título.

ISSN: 2965-7679

87

Ensaio baseado em fluorescência para a identificação de inibidores da protease nsP2 do vírus Chikungunya (CHIKV)

FERNANDES, Rafaela Sachetto¹; OLIVA, Glaucius¹; CIPRIANO, Lavinia¹; FAIRHEAD, Michael²; GODOY, Andre Schutzer de¹; DOLCI, Isabela¹; NOSKE, Gabriela Dias¹

lavinia@ifsc.usp.br

¹Instituto de Física de São Carlos – USP; ²Centre for Medicines Discovery CMD, University of Oxford

O vírus Chikungunya (CHIKV), pertencente à família *Togaviridae*, é o agente causador da febre chikungunya, uma doença debilitante que pode evoluir para artrite crônica. (1) Atualmente, não existem tratamentos antivirais específicos disponíveis, o que torna urgente o desenvolvimento de terapias direcionadas. (2) A protease viral (nsP2pro) é crucial para o processamento da poliproteína nsP1234 em quatro proteínas não-estruturais (nsPs1 - 4), configurando-se como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos. (3) Neste estudo, foi obtida a nsP2pro recombinante e estabelecido um ensaio enzimático para a triagem de compostos com potencial ação contra o CHIKV. A sequência da protease (resíduos 212 a 535) foi clonada no vetor pET-TRX, expressa em *E. coli* BL21 em meio TB e purificada por meio de cromatografias de afinidade a níquel e de exclusão molecular. Um ensaio baseado em fluorescência foi desenvolvido utilizando o substrato sintético DABCYL-DRAG↓YIFY-EDENS-NH₂, que inclui o sítio de clivagem nsP3/nsP4 do CHIKV, um doador fluorescente (EDANS) e um acceptor de apagamento (DABCYL). A reação foi realizada em tampão HEPES 25 mM pH 7,5, incubada por 30 minutos e monitorada por 2 horas a 30°C. As concentrações de proteína e substrato utilizadas na reação foram de 600 nM e 20 μ M, respectivamente. A biblioteca MMV Hit Generation Library 1 (HGL1), contendo 5.632 moléculas, foi testada em ensaio de ponto único (10 μ M), resultando na inibição de mais de 80% da atividade enzimática da nsP2pro por 72 destas moléculas. O próximo passo é determinar os valores de concentração inibitória (IC₅₀) para estes compostos e validar os resultados em ensaios fenotípicos utilizando uma linhagem celular expressando o replicon repórter de CHIKV, a BHK-21-RepT7-Gluc-nsP-CHIKV-99650, desenvolvida e caracterizada por nosso grupo de pesquisa. Isso permitirá determinar a eficácia e a toxicidade dessas moléculas, contribuindo para a identificação de potenciais inibidores da replicação do CHIKV.

Palavras-chave: Chikungunya; Protease; Ensaio enzimático.

Agência de fomento: Fapesp (2022/01266-3)

Referências:

- 1 VAN AALST, M. *et al.* Long-term sequelae of chikungunya virus disease: a systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 8-22, Jan.-Feb. 2017. DOI: 10.1016/j.tmaid.2017.01.004
- 2 MILLSAPPS, E. M.; UNDERWOOD, E. C.; BARR, K. L. Development and application of treatment for Chikungunya fever. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 13, p. 55-66, Dec. 2022.

DOI: 10.2147/rrtm.s370046.

3 NARWAL, M. *et al.* Crystal structure of chikungunya virus nsP2 cysteine protease reveals a putative flexible loop blocking its active site. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 451–462, Sept. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.007.