

RESUMO

Leishmania amazonensis é agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana, uma das formas clínicas da leishmaniose, zoonose de difícil tratamento, que pode apresentar severos efeitos colaterais, sendo urgente a identificação de moléculas-alvo/novas drogas como alternativas terapêuticas. Sirtuínas são proteínas componentes de uma grande família de lisina desacetilases dependentes de NAD⁺, e, em *Leishmania sp.*, o membro Sir2RP1 apresenta papel essencial para sobrevivência e desenvolvimento do parasita. Recentemente, nós caracterizamos o ortólogo de *L. amazonensis* (LaSir2RP1): mostramos que a proteína é expressa e secretada pelas formas promastigota e amastigota, e, após clonagem, expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante, verificamos que a proteína, que possui um único resíduo de triptofano (Trp) localizado em ambiente apolar, se encontra bem enovelada, monomérica, apresentando conteúdo de alfa-hélices da ordem de 20%, e, assim como outros membros da família das sirtuínas, apresenta atividade desacetilásica NAD⁺-dependente. Uma vez que resveratrol interfere em rota metabólica dependente de sirtuínas em mamíferos e é leishmanicida, o que determinamos para formas promastigotas de *L. amazonensis*, iniciamos estudo de seus potenciais efeitos em LaSir2RP1. Usando técnicas espectroscópicas, determinamos que o composto interage com a sirtuína recombinante, ligando-se a ela com estequiometria 1:1 e constante de interação $(0,06 \pm 0,03) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Resveratrol possivelmente interage com LaSir2RP1 em ambiente próximo ao resíduo de Trp, o que foi sugerido pela interferência da droga na transferência de energia de Förster entre Trp e a sonda bis-ANS (fluorescente quando ligada à porções hidrofóbicas da proteína), previamente determinada. Resveratrol, na concentração de 100 μM , inibe a atividade desacetilásica de rLaSir2RP1 em $\sim 20\%$ ($p = 0,01$).

RESULTADOS

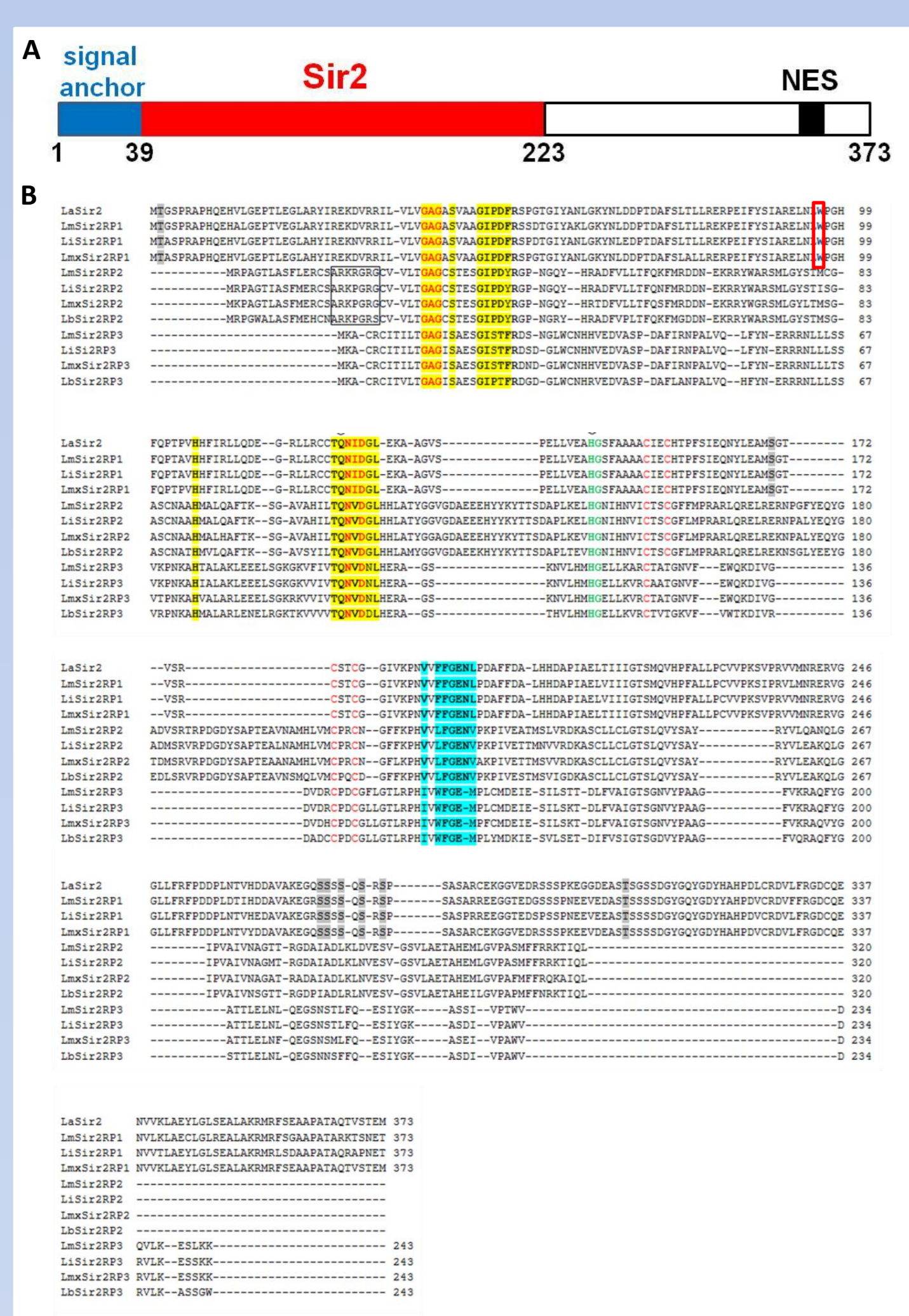


Figura 1 – (A) Estrutura primária de LaSir2RP1. O gene de LaSir2RP1 foi amplificado por PCR e sequenciado. A sequência de aminoácidos apresenta uma âncora sinal na porção N-terminal, o sítio catalítico Sir2 na porção central e um motivo sinal de exclusão nuclear (NES), na porção C-terminal. **(B) Múltiplo alinhamento de sequências de sirtuínas de *Leishmania sp.*** O alinhamento foi realizado com o programa ClustalW. Motivos GAG e NID são essenciais para a função de silenciamento de Sir2, assim como as 4 cisteínas do C4 zinc finger domain (vermelho). Resíduos conservados HG são essenciais para a atividade ADP ribosiltransferase estão em verde e os preditos como interatores de peptídeos acetilados estão em azul ciano. O quadro vermelho destaca o resíduo de triptofano, único e conservado nas Sir2RP1.

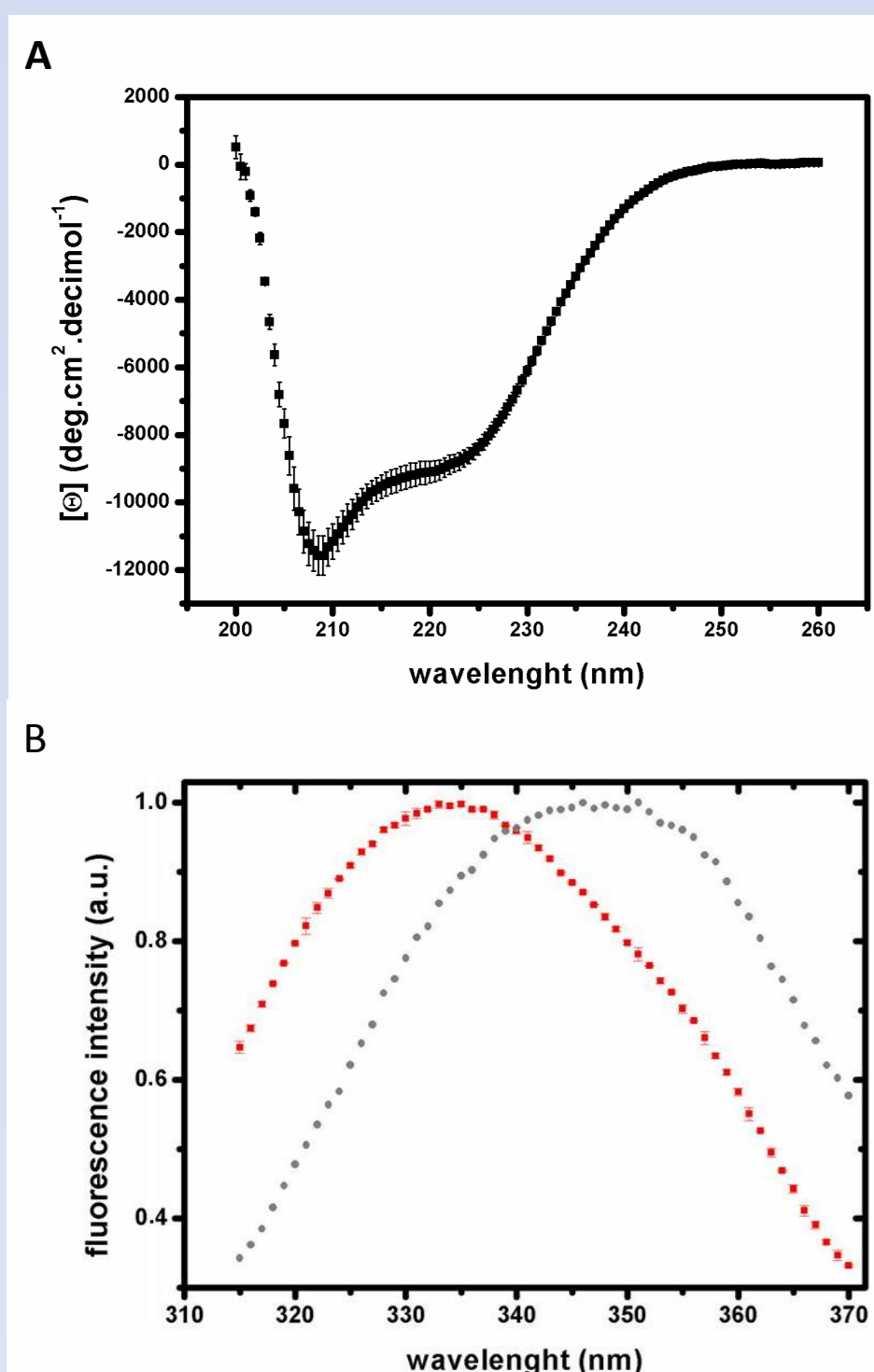


Figura 3 – Caracterização espectroscópica de LaSir2RP1. (A) Análise de Dicroísmo Circular de LaSir2RP1 revela espectro rico em alfa-hélices, com mínimo em 208 nm. (B) LaSir2RP1 (vermelho) foi excitada em 295 nm e o espectro de fluorescência apresentou λ_{max} em 335 nm, sugerindo que o único triptofano não está exposto. Como controle, espectro de LaSir2RP1 incubada com 4 M de uréia foi analisado (cinza). Neste caso, onde a proteína está desnaturada e W está exposto, λ_{max} foi alterado para 346 nm.

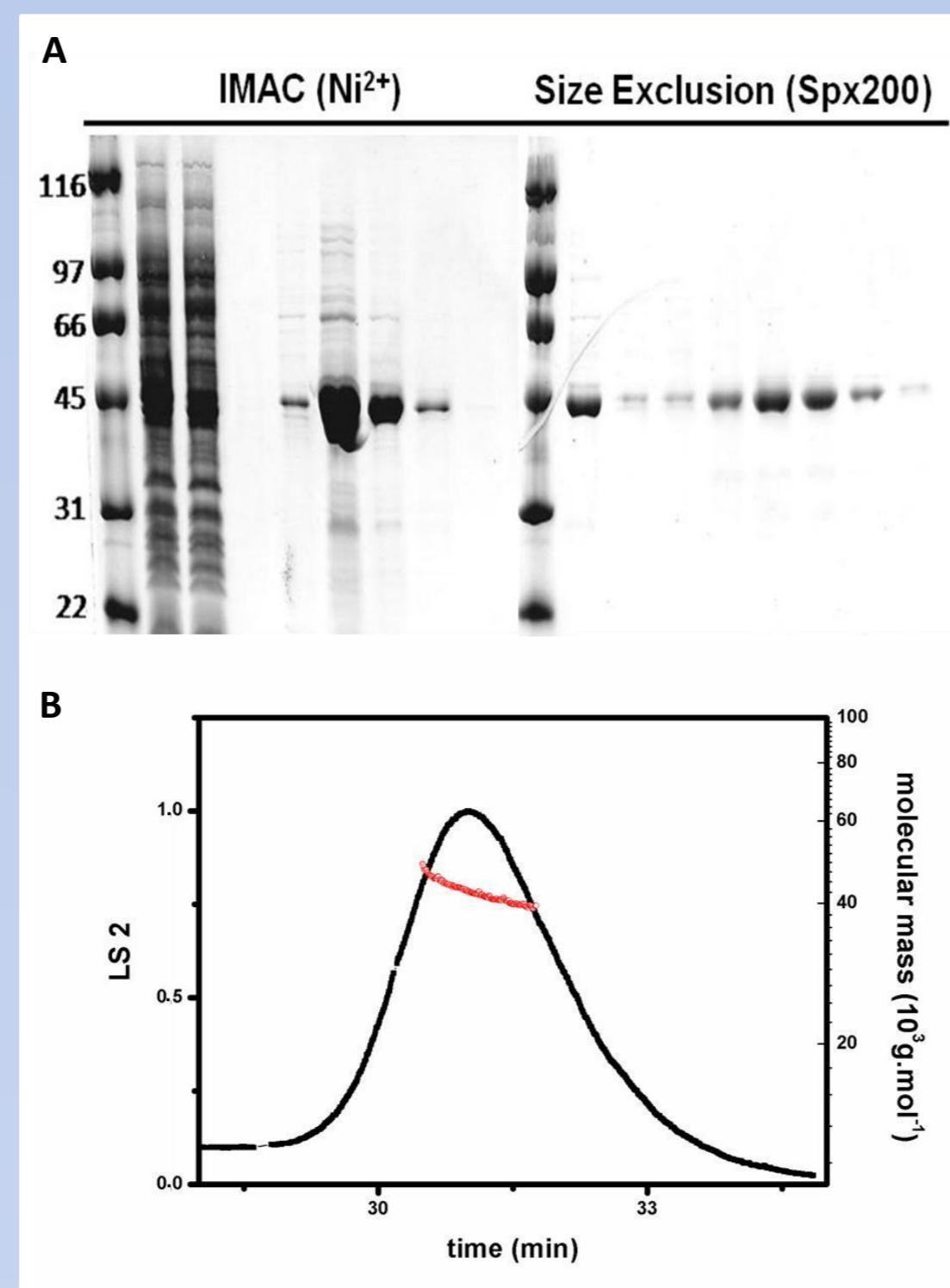


Figura 2 – (A) Purificação de LaSir2RP1. 6xHis-LaSir2RP1 (LaSir2RP1) foi obtida por expressão heteróloga em bactéria. A proteína recombinante foi purificada usando duas etapas cromatográficas. A análise por SDS-PAGE das frações obtidas por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) e cromatografia de exclusão molecular (Spx200) estão mostradas. **(B) LaSir2RP1 é obtida como monômero.** LaSir2RP1 purificada foi analisada usando um detector MALLS durante a eluição da cromatografia de exclusão molecular e o principal pico apresentou polidispersidade de $1,023 \pm 0,009$ % e massa molar de $(43,6 \pm 0,3) \times 10^3 \text{ g/mol}$, sugerindo que a proteína purificada é um monômero.

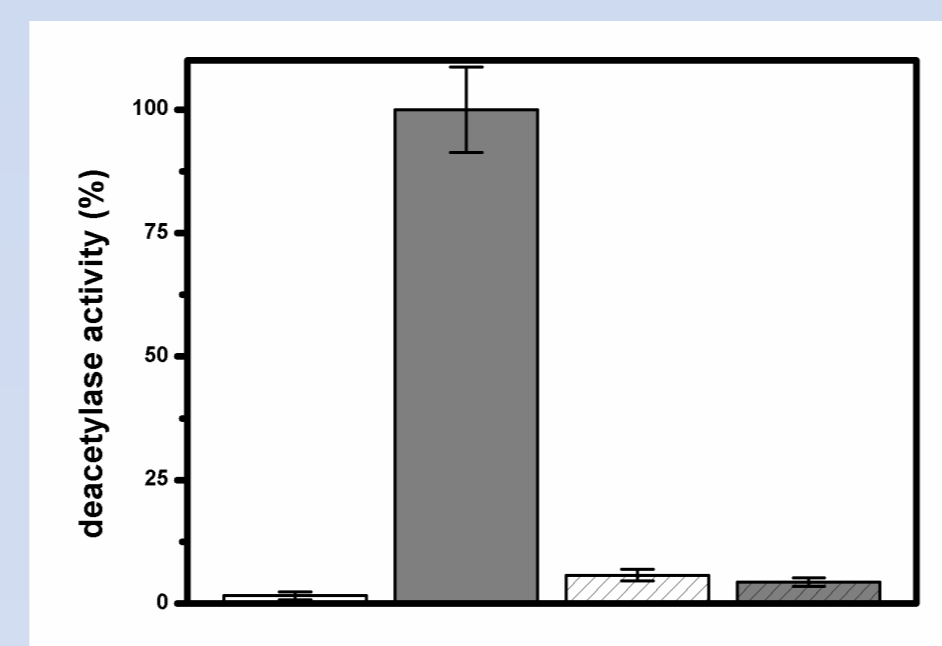


Figura 4 - LaSir2RP1 é uma desacetilase dependente de NAD⁺. (A) Atividade desacetilásica de LaSir2RP1 foi avaliada usando um peptídeo derivado da proteína p53 como substrato acetilado num meio de reação sem (branco) ou com 1 mM NAD⁺ (cinza) na ausência (liso) ou na presença (hachurado) de 4 M de uréia.

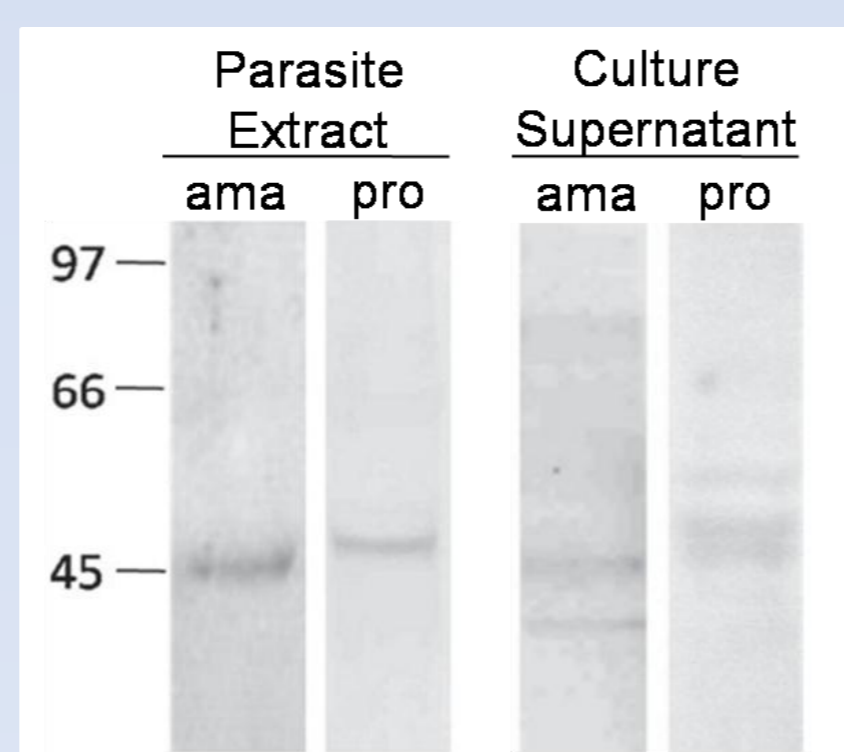


Figura 5 – LaSir2RP1 é expressa e secretada pelas formas amastigota e promastigota de *L. amazonensis*. Extratos de parasitas e sobrenadantes de culturas de promastigotas (pro) e amastigotas (ama) foram analisados por Western blot desenvolvido com soro policlonal contendo anticorpos contra LaSir2RP1 recombinante, obtido após imunização de coelhos com a proteína purificada.

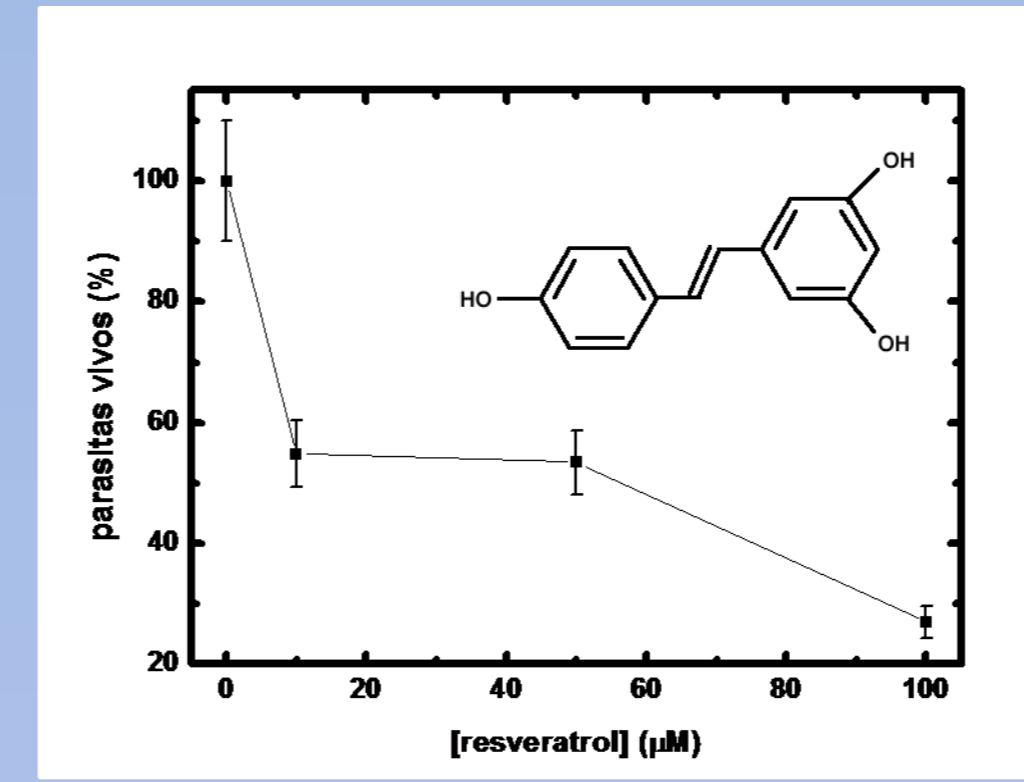


Figura 6 – Efeitos de resveratrol no crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas (10^6 parasitas/mL) foram tratados com resveratrol nas concentrações indicadas por 48h, a 26°C. Após, o número de parasitas em cada condição foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. 100% corresponde a $(1,7 \pm 0,2) \times 10^7$ parasitas/mL. 0 μM resveratrol é condição com DMSO na concentração 0,02%, idêntica aos outros pontos, e não apresentou efeito no crescimento/viabilidade dos promastigotas, em comparação ao controle sem tratamento. No detalhe, estrutura do resveratrol.

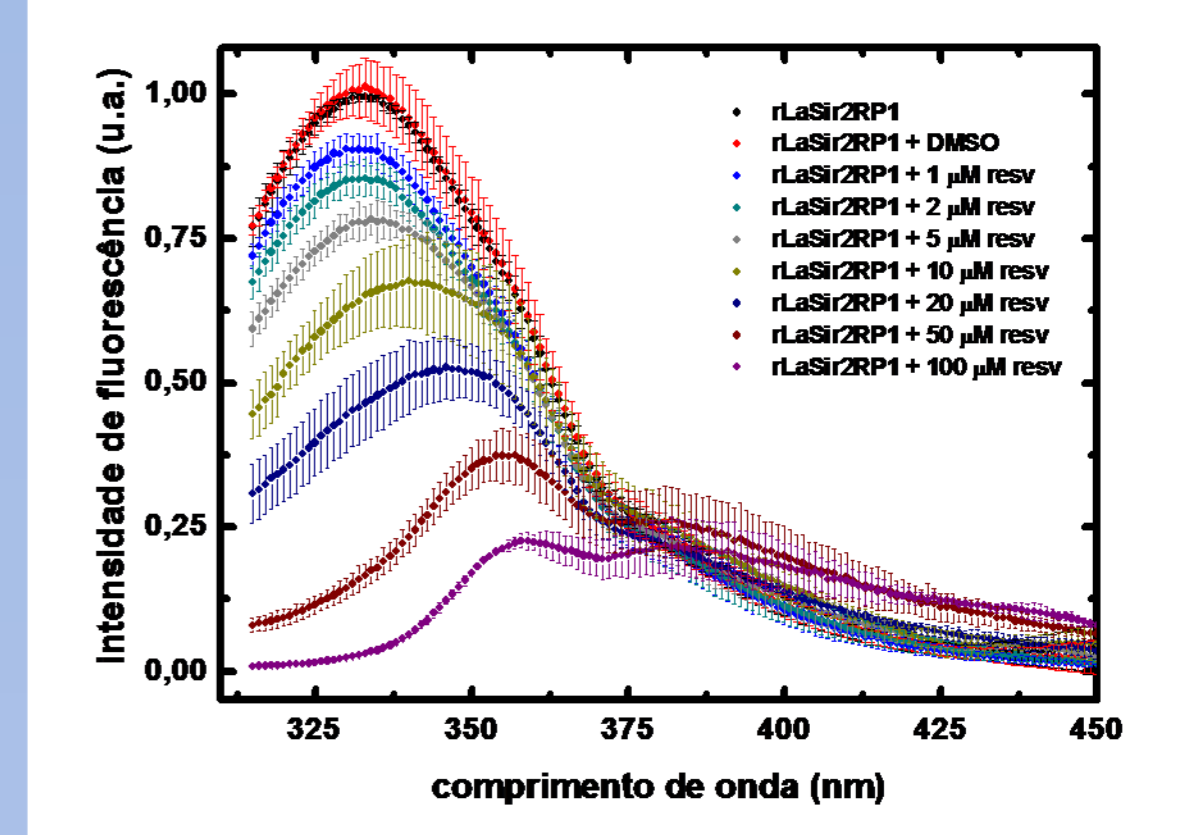


Figura 7 – Resveratrol altera perfil de emissão de fluorescência de LaSir2RP1. Solução de 3 μM LaSir2RP1 foi excitada em 280 nm e o espectro de fluorescência apresentou λ_{max} em $333 \pm 1 \text{ nm}$. Na presença de concentrações crescentes de resveratrol (resv), indicadas na figura, a emissão em 333 nm foi diminuída. DMSO foi usado em concentração final de 1% em todos os casos, não alterando o espectro de LaSir2RP1. A figura apresenta a média \pm desvio padrão de valores obtidos em distintas aferições. u.a.= unidade arbitrária.

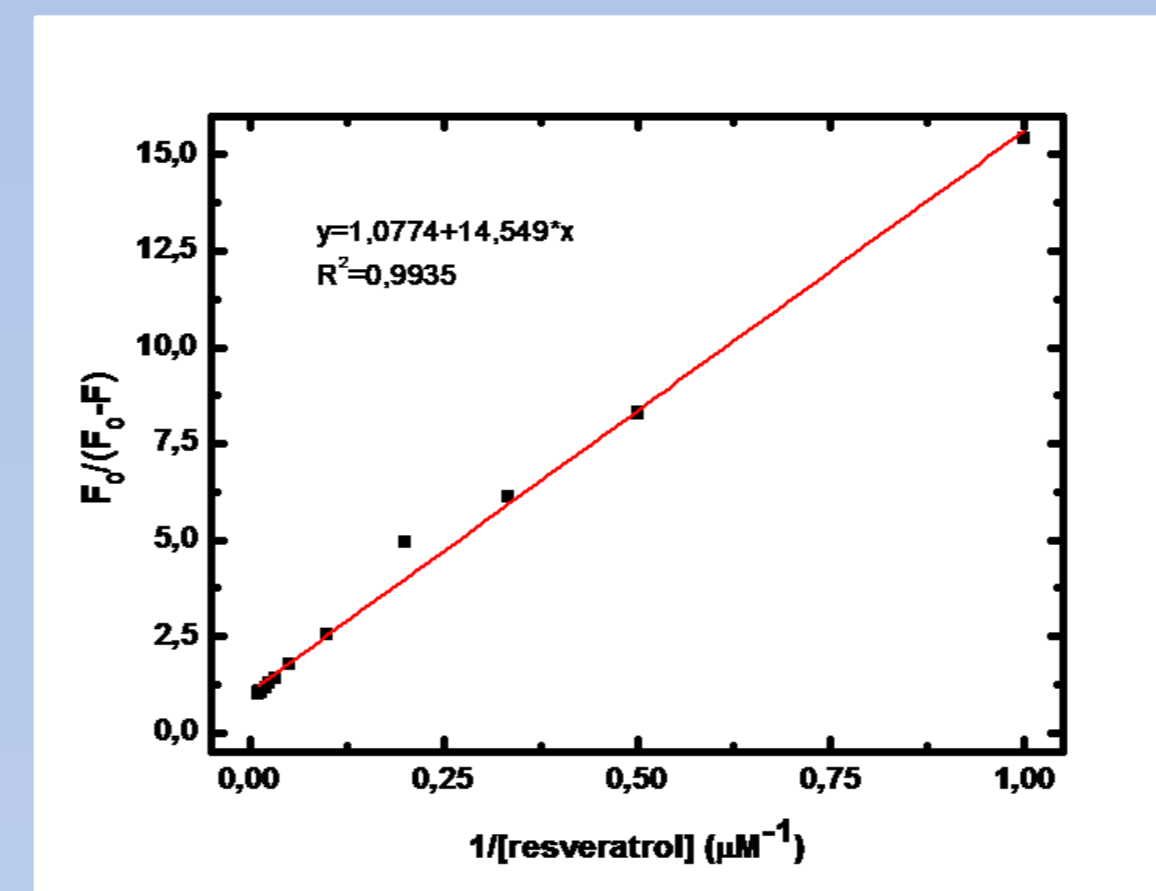


Figura 8 – Determinação da constante de ligação de resveratrol à rLaSir2RP1. $K_{\text{resv-LaSir2RP1}}$. Dados extraídos do gráfico da figura 7 foram substituídos na equação de Stern-Volmer modificada, $F_0/(F_0-F) = 1/(fK_{\text{sv}}[Q]) + (1/f)$, para determinar K_{sv} , a constante de Stern-Volmer, equivalente à constante de ligação. F_0 é a intensidade de fluorescência inicial de LaSir2RP1+1% DMSO em 335 nm e F, a intensidade de fluorescência na presença do ligante, [Q] é a concentração molar do ligante. O valor médio obtido foi: $K_{\text{resv-LaSir2RP1}} = (0,06 \pm 0,03) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

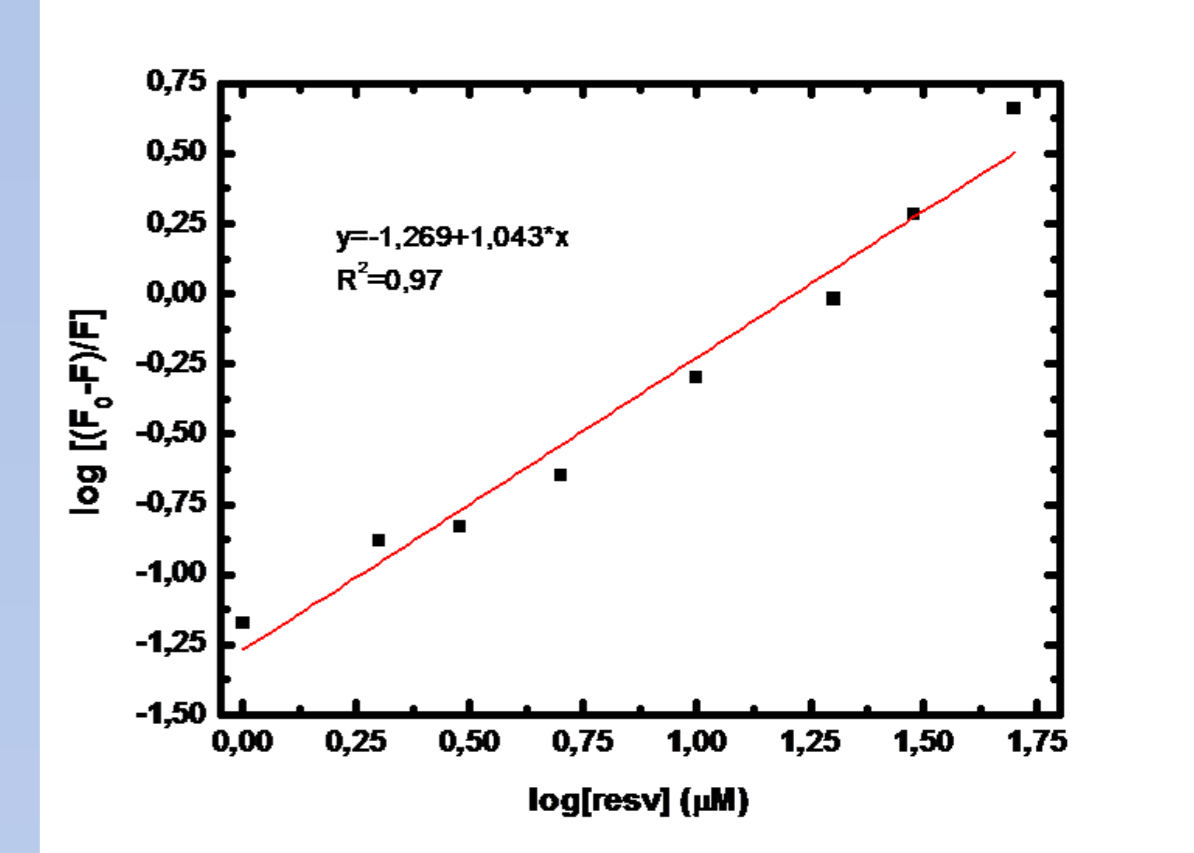


Figura 9 – Determinação do número de moléculas de resveratrol (n) ligadas ao complexo resveratrol-LaSir2RP1. O número de moléculas de ligante por molécula de proteína foi calculado a partir da equação: $\log[(F_0-F)/F] = \log K_{\text{sv}} + n \log[\text{ligante}]$. O gráfico apresentado é representativo. O valor médio obtido a partir de determinações distintas foi $n = 1,2 \pm 0,2$.

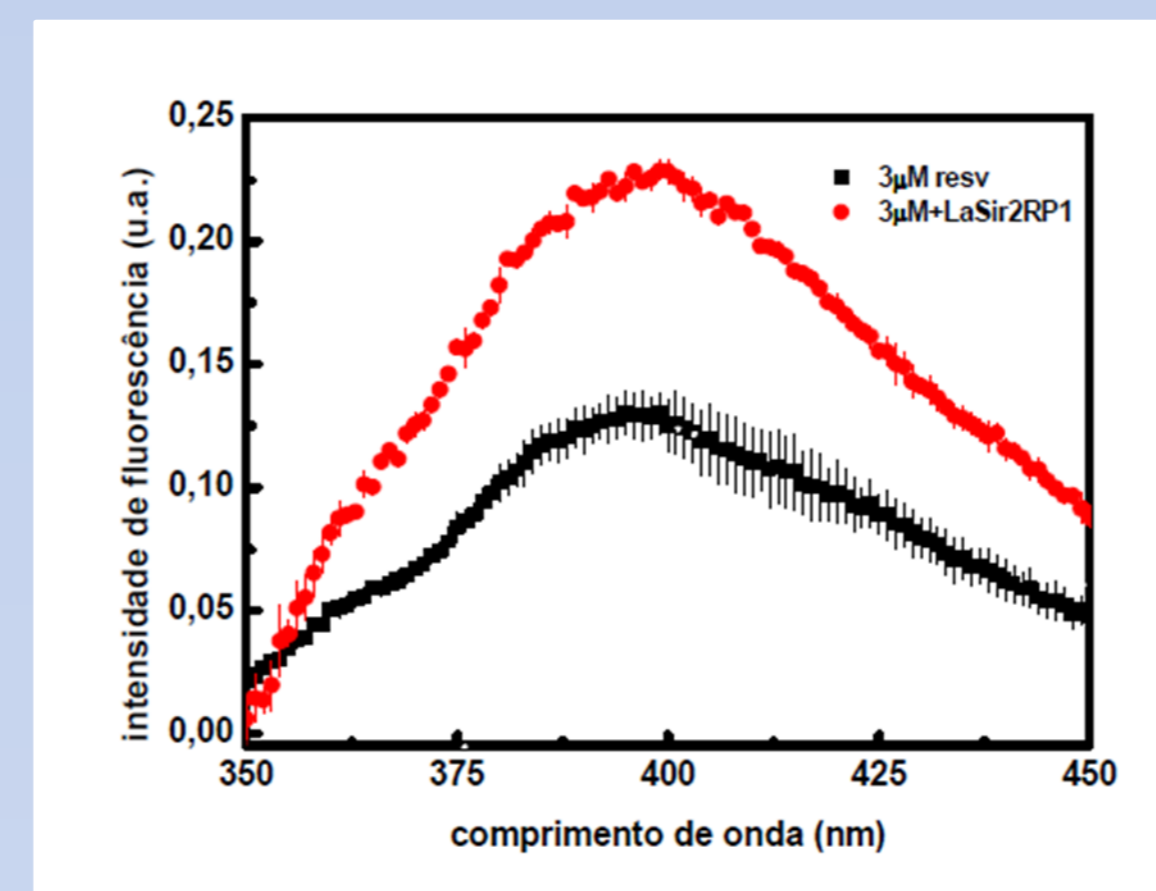


Figura 10 – Ligação de rLaSir2RP1 altera a intensidade de fluorescência do resveratrol. Espectro de fluorescência de solução de 3 μM resveratrol (resv) foi adquirido sob excitação em 300 nm (quadrado preto). Na presença de 3 μM de LaSir2RP1 a fluorescência de 3 μM resv (círculo vermelho) é aumentada. O gráfico mostra média e desvio padrão de aferições distintas. u.a.= unidade arbitrária.

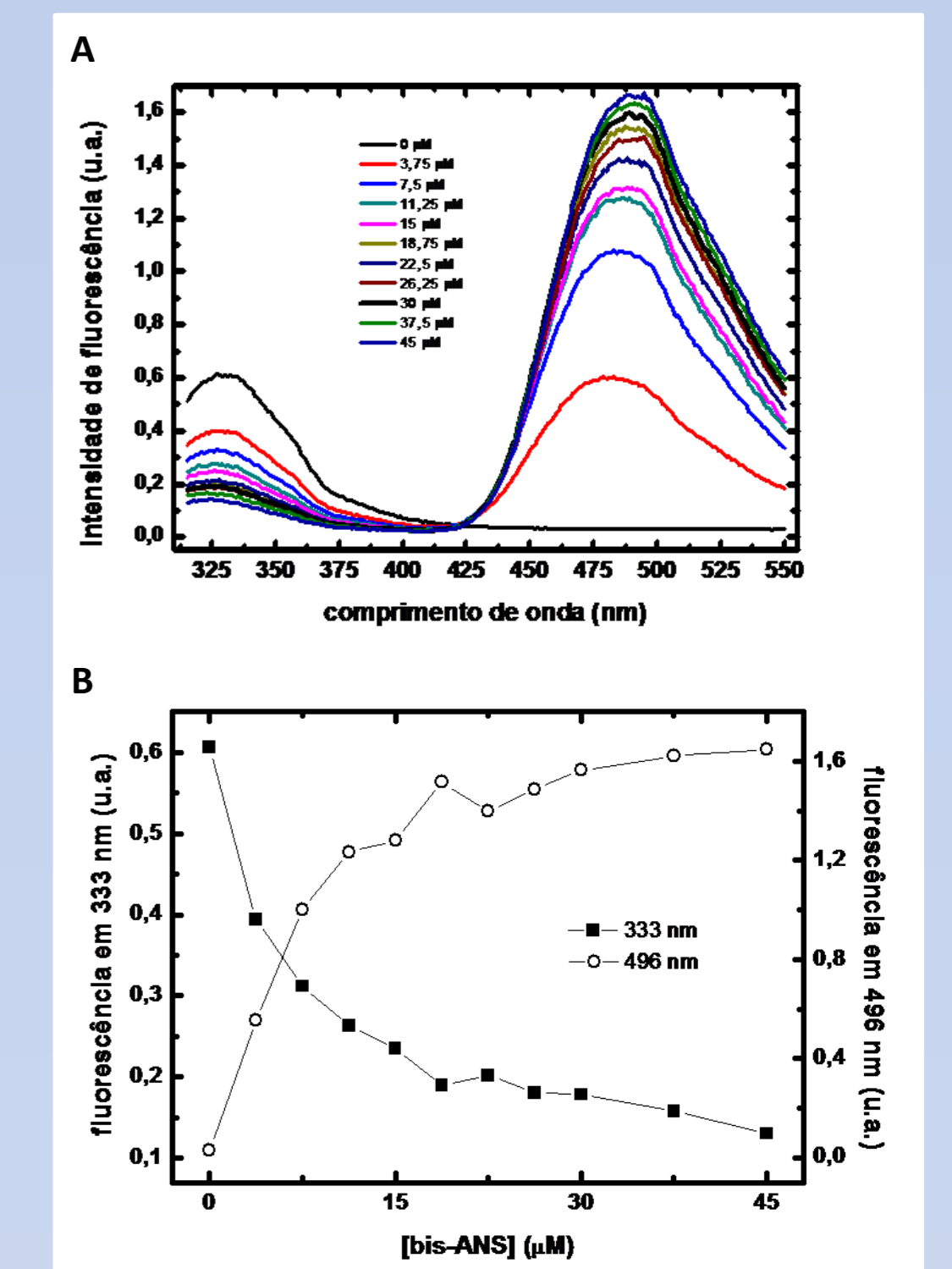


Figura 11 – Transferência de energia do triptofano de LaSir2RP1 ao bis-ANS sob excitação em 280 nm. (A) Espectros de emissão do complexo 3 μM LaSir2RP1+ bis-ANS nas concentrações indicadas, sob excitação em 280 nm. (B) O gráfico mostra a fluorescência do triptofano (333 nm, \blacksquare) e do bis-ANS (496 nm, \square), adquiridas simultaneamente, sob excitação em 280 nm, em varreduras de 315 a 600 nm, em função da concentração de bis-ANS. u.a.= unidade arbitrária.

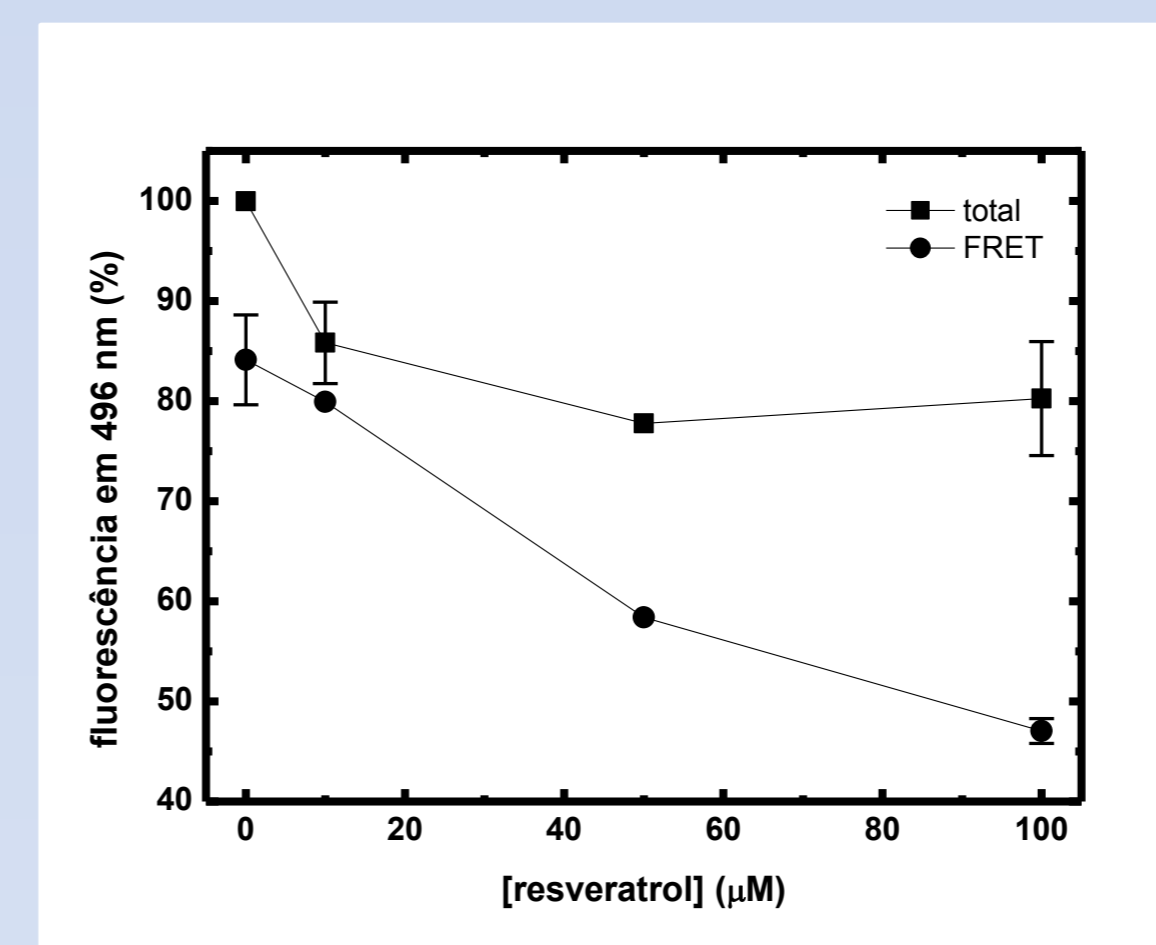


Figura 12 – Análise da fluorescência do complexo bis-ANS-LaSir2RP1 na presença de resveratrol. Soluções contendo 3 μM LaSir2RP1 e 30 μM bis-ANS foram acrescidas de resveratrol nas concentrações indicadas e excitadas em \blacksquare 365 nm para avaliar a emissão total de bis-ANS ou excitadas em \bullet 280 nm para avaliar a emissão de bis-ANS devida ao FRET. O gráfico mostra médias \pm desvio padrão.

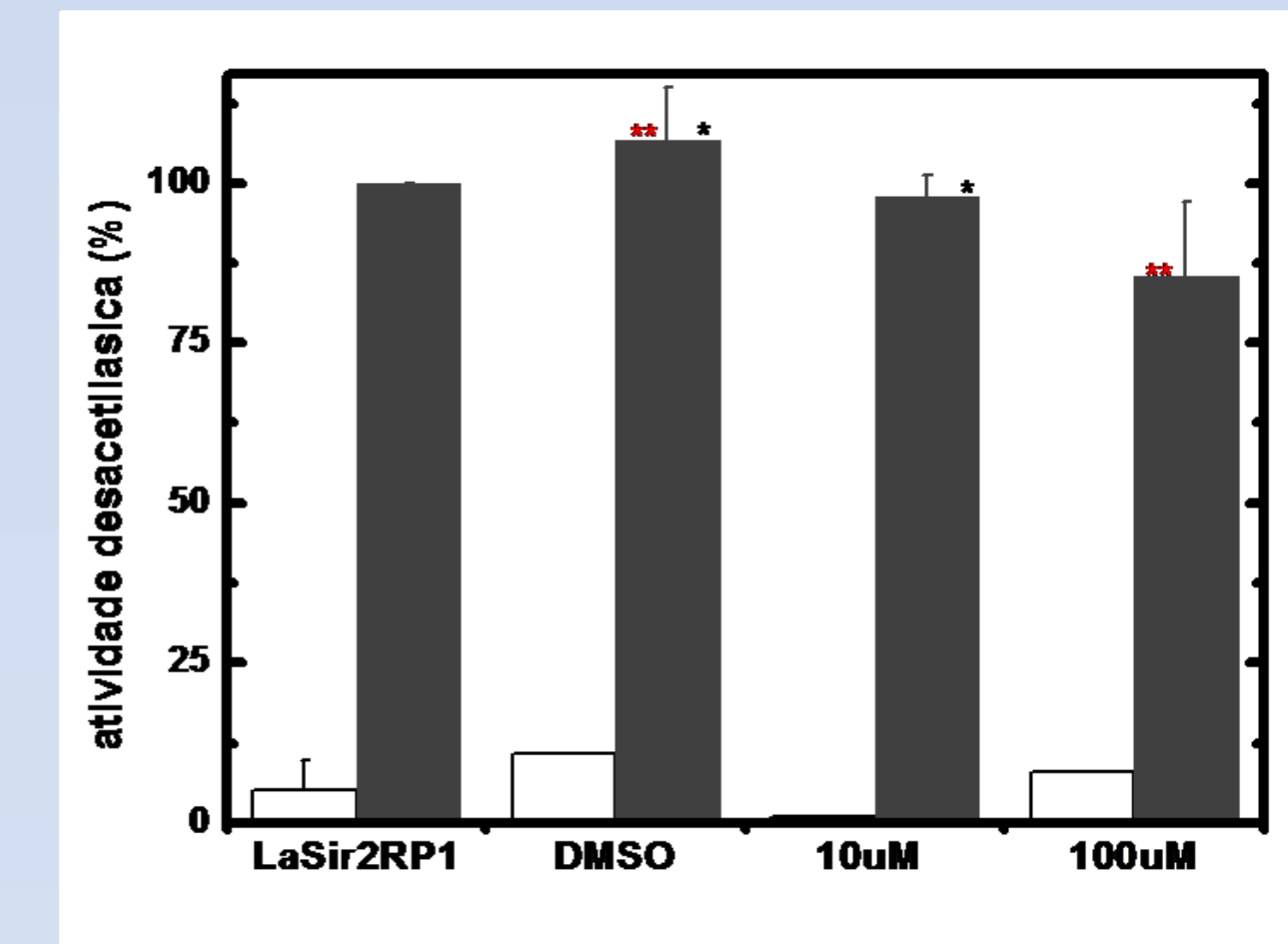


Figura 13 – Avaliação da atividade desacetilásica de rLaSir2RP1 na presença de resveratrol. Atividade desacetilásica de LaSir2RP1 (3 μM) na presença (barra cinza) e na ausência (barra branca) de 1 mM de NAD⁺ foi avaliada após incubação com 10 μM de substrato, na ausência (LaSir2RP1) e na presença de 1% DMSO ou de resveratrol, nas concentrações indicadas. Teste T de Student foi realizado: * $p=0,03$ e ** $p=0,01$.

CONCLUSÃO

O estudo realizado mostrou que o polifenol resveratrol, interage com rLaSir2RP1, sirtuína recombinante do parasita *Leishmania amazonensis*, ligando-se a ela com estequiometria 1:1 e constante de interação $(0,06 \pm 0,03) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Resveratrol possivelmente interage com rLaSir2RP1 em ambiente próximo ao resíduo de Trp e, na concentração de 100 μM , inibe a atividade desacetilásica de rLaSir2RP1 em $\sim 20\%$ ($p = 0,01$). Os dados sugerem interação e modulação negativa de resveratrol na função catalítica de rLaSir2RP1, o que pode ser relevante *in vivo*.

AGRADECIMENTO