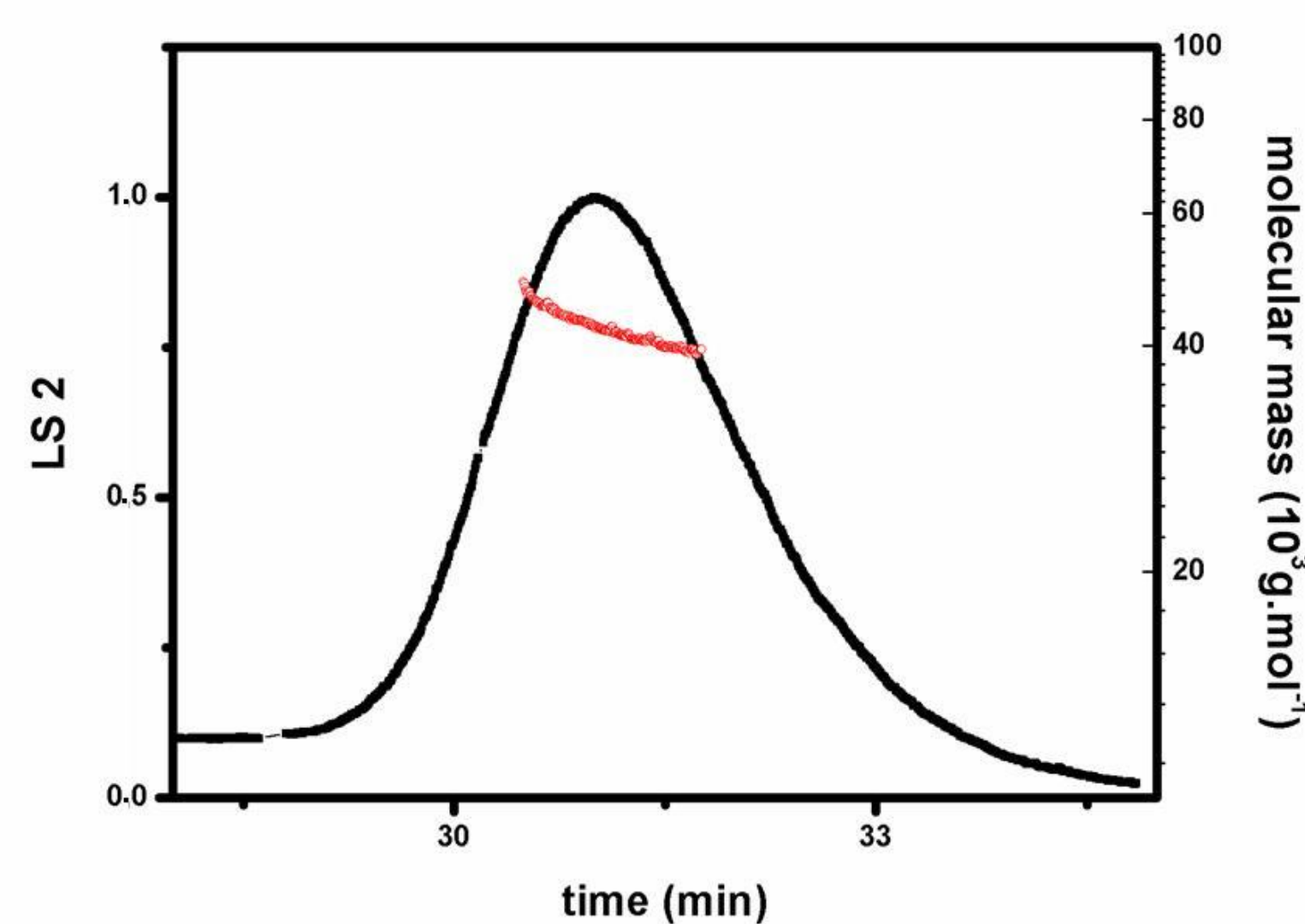


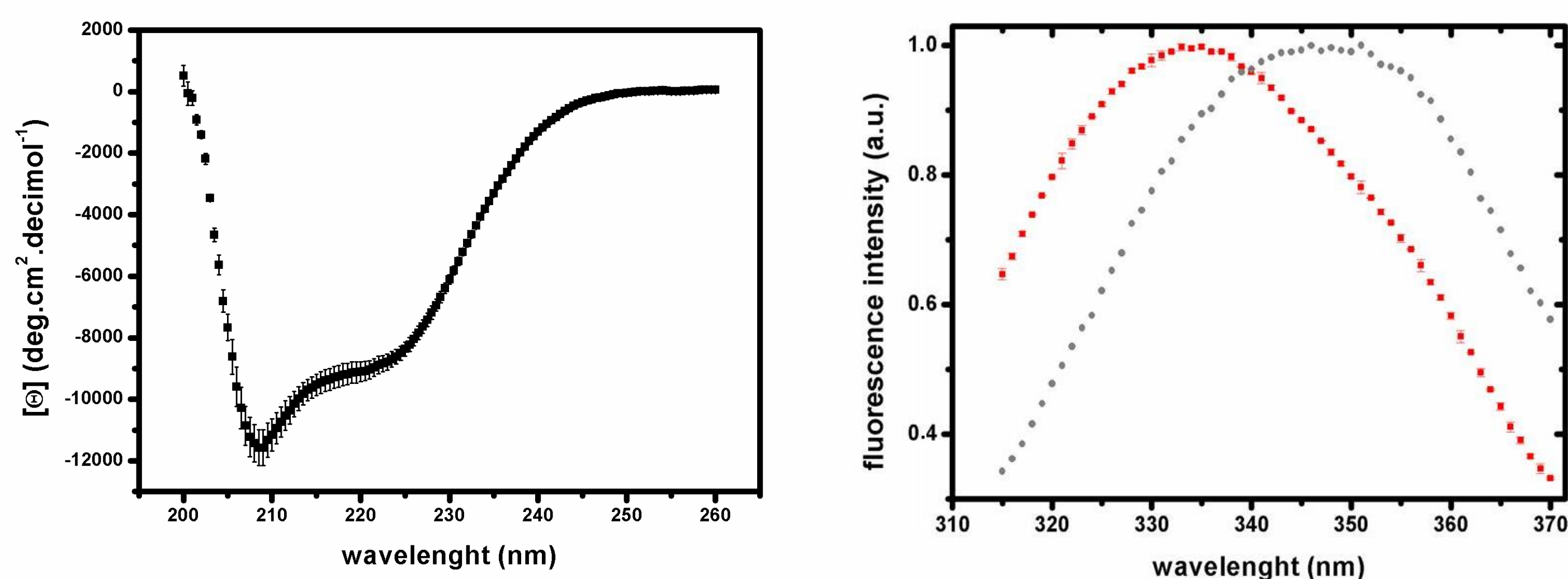
## RESUMO

*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<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup>-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 com alta afinidade. 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 ~ 20% ( $p = 0,01$ ).

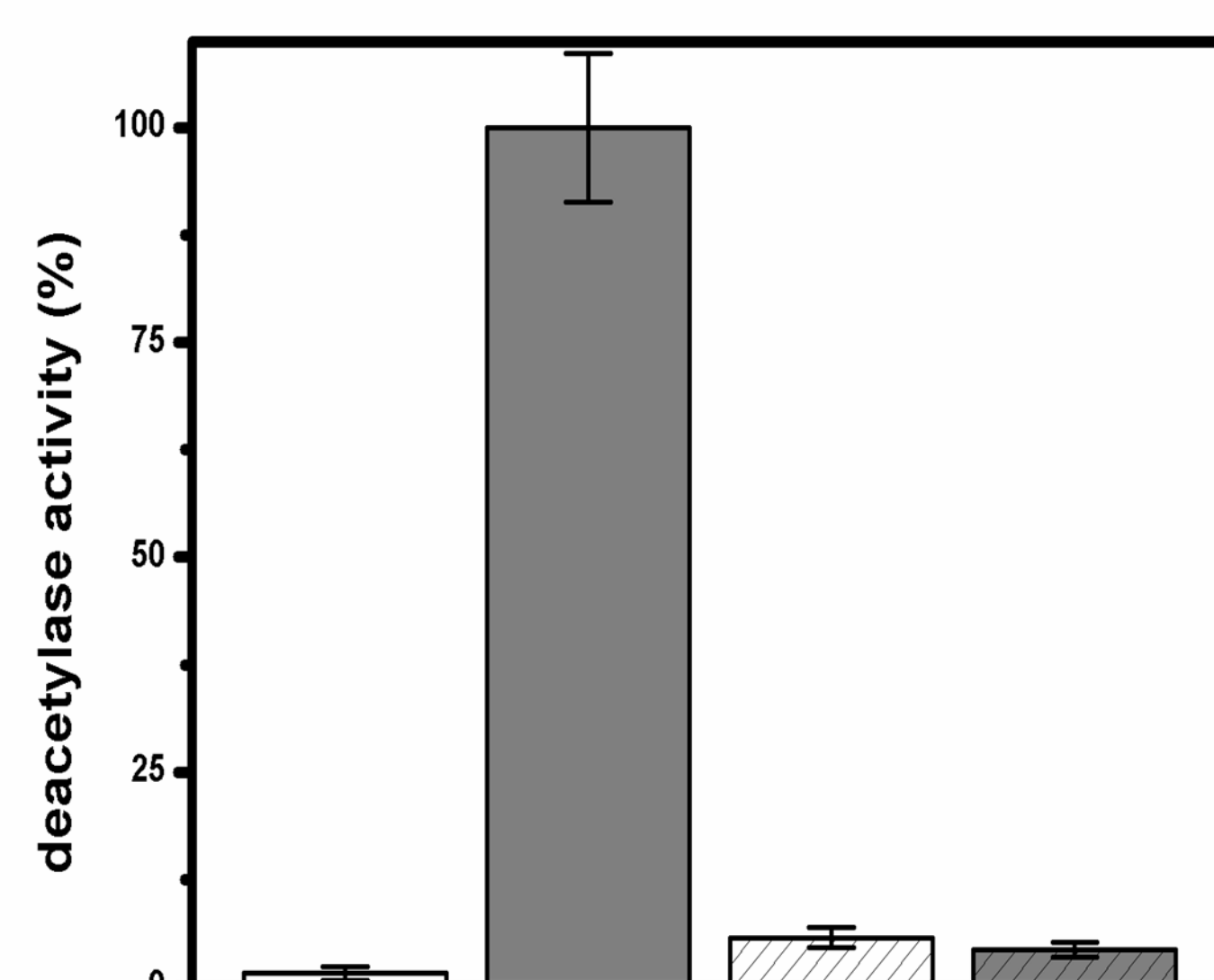
## RESULTADOS



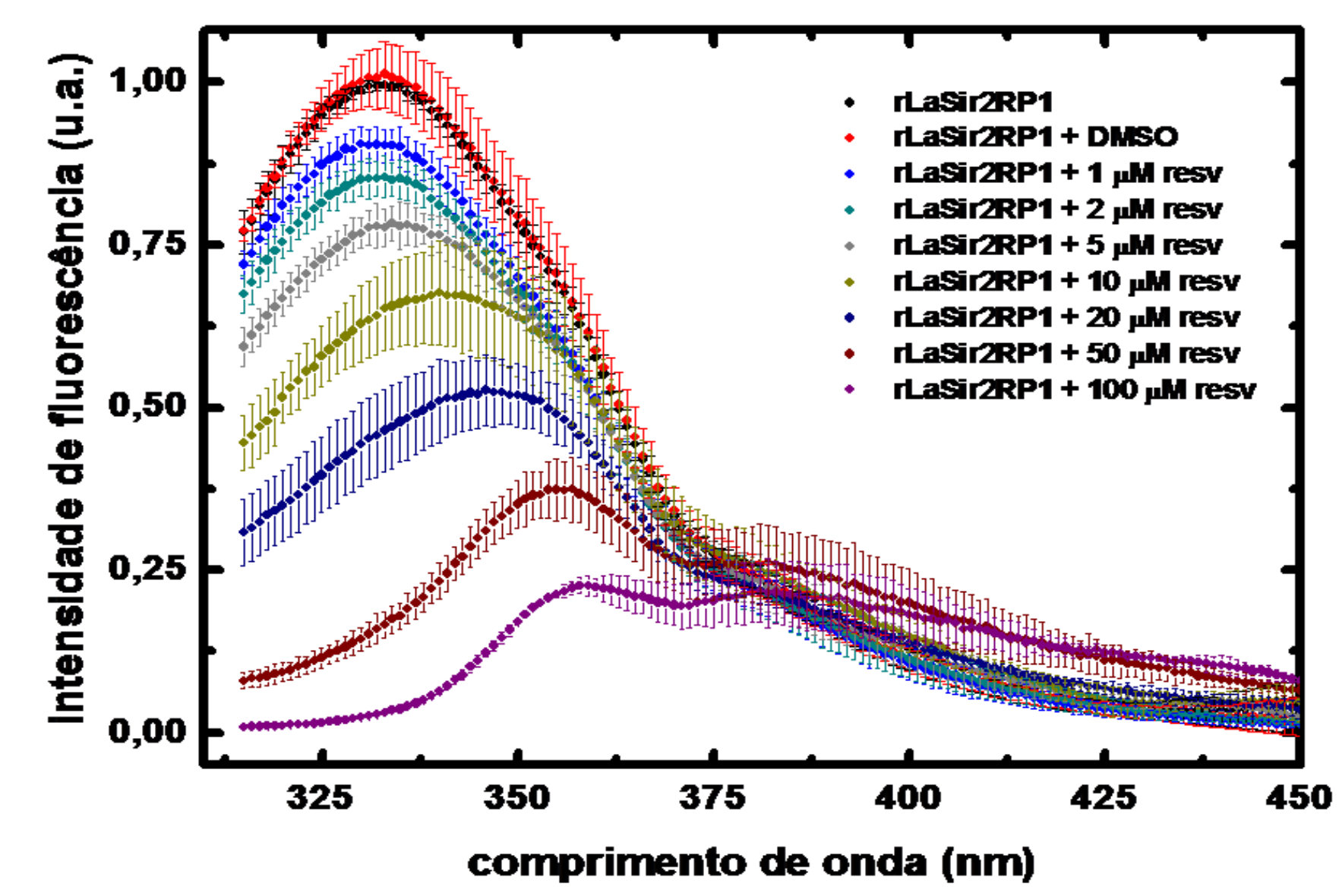
**Figura 1** LaSir2RP1 é obtida como monômero. LaSir2RP1 purificada foi analisada usando um detector MALLS durante a eluição da cromatografia de exclusão molecular e o principal pico apresentou polidispersidade de  $1,023 \pm 0,009$  e massa molar de  $(43,6 \pm 0,3) \times 10^3$  g/mol, sugerindo que a proteína purificada é um monômero.



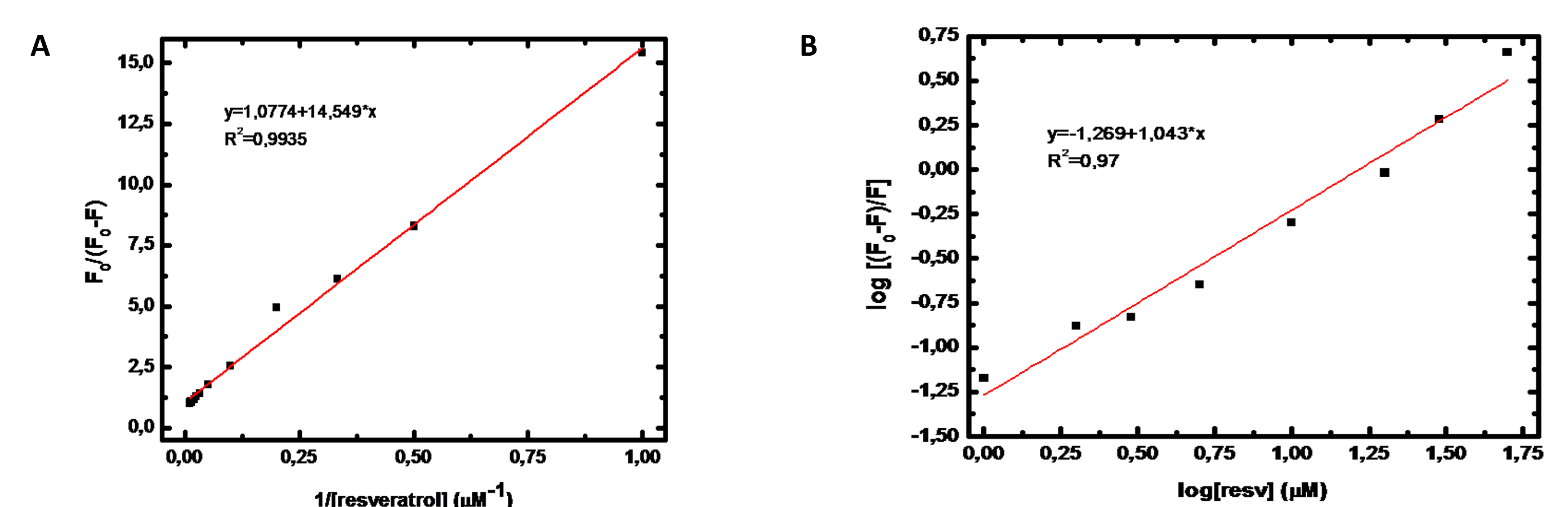
**Figura 2** – Caracterização espectroscópica de LaSir2RP1. (A) Análise de Dicroísmo Circular de LaSir2RP1 revela espectro rico em alfa-hélices, com mínimo em 208 nm. (B) LaSir2RP1 (vermelho) foi excitada em 295 nm e o espectro de fluorescência apresentou  $\lambda_{max}$  em 335 nm, sugerindo que o 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,  $\lambda_{max}$  foi alterado para 346 nm.



**Fig. 3.** LaSir2RP1 é uma desacetilase dependente de NAD<sup>+</sup>. (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<sup>+</sup> (cinza) na ausência (liso) ou na presença (hachurado) de 4 M de uréia.

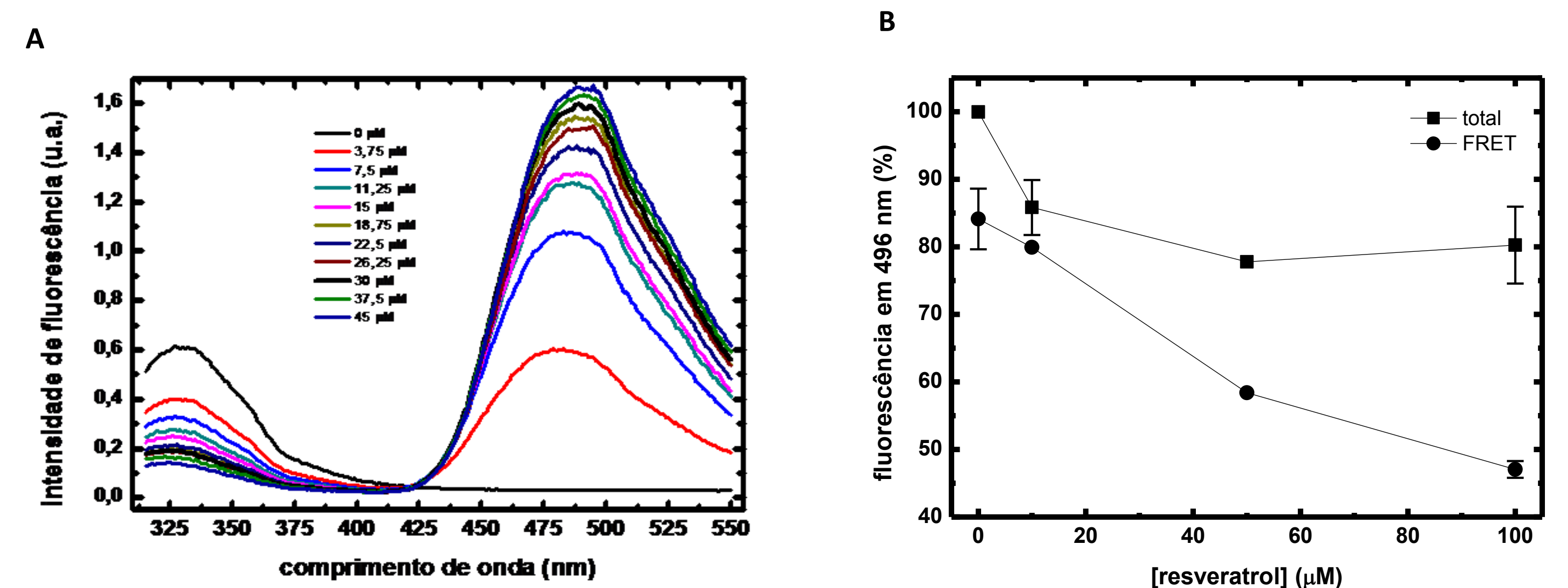


**Figura 4** – Resveratrol altera perfil de emissão de fluorescência de LaSir2RP1. Solução de 3 μM LaSir2RP1 foi excitada em 280 nm e o espectro de fluorescência apresentou  $\lambda_{max}$  em  $333 \pm 1$  nm. Na presença de concentrações crescentes de resveratrol (resv), indicadas na figura, a emissão 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 ± desvio padrão de valores obtidos em distintas aferições. u.a. = unidade arbitrária.



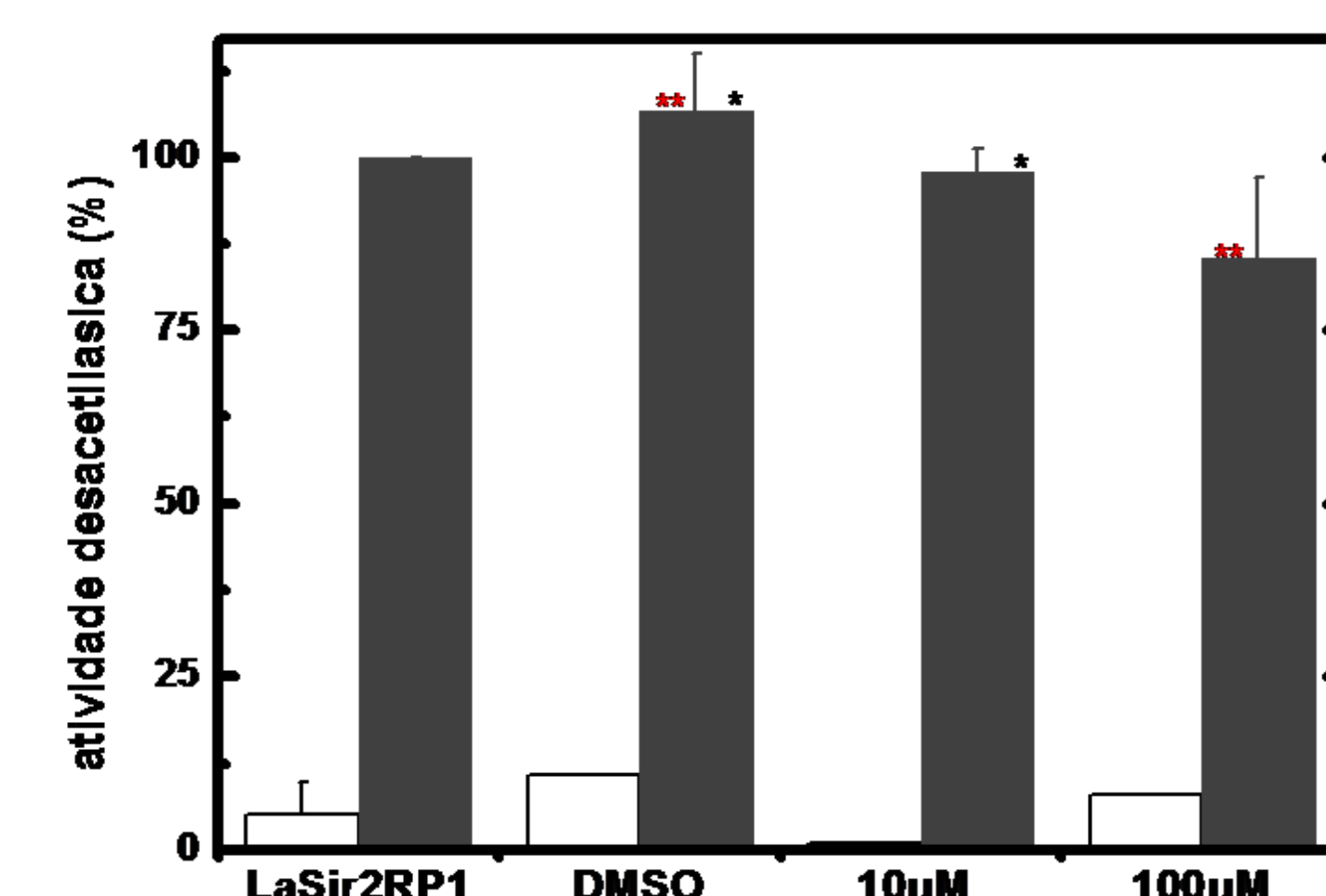
**Figura 5** – A. Determinação da constante de ligação de resveratrol à rLaSir2RP1.  $K_{resv-LaSir2RP1}$ . Dados extraídos do gráfico da figura 7 foram substituídos na equação de Stern-Volmer modificada,  $F_0/(F_0-F) = 1/(K_{SV}[Q]) + (1/f)$ , para determinar  $K_{SV}$ , a constante de Stern-Volmer, 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:  $K_{resv-LaSir2RP1} = (0,06 \pm 0,03) \times 10^6$  M<sup>-1</sup>.

**B. 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:  $\log[(F_0-F)/F] = \log K_{SV} + n \log[ligante]$ . O gráfico apresentado é representativo. O valor médio obtido a partir de determinações distintas foi  $n = 1,2 \pm 0,2$ .



**Figura 6** – A. 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. 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 (■) 365 nm para avaliar a emissão total de bis-ANS ou excitadas em (●) 280 nm para avaliar a emissão de bis-ANS devida ao FRET. O gráfico mostra médias ± desvio padrão.



**Figura 7** – 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<sup>+</sup> 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  $(0,06 \pm 0,03) \times 10^6$  M<sup>-1</sup>. 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 ~ 20% ( $p = 0,01$ ). Os dados sugerem interação e modulação negativa de resveratrol na função catalítica de rLaSir2RP1, o que pode ser relevante para a função *in vivo*.

## AGRADECIMENTO