

## Padronização de ensaios biológicos para a enzima superóxido dismutase de *Leishmania braziliensis*

Camila C. B. Brito(PG)<sup>1</sup>, Fernando V. Maluf (PG)<sup>2</sup>, Gustavo M. A. de Lima (PG)<sup>2</sup>, Rafael. V. C. Guido(PQ)<sup>2</sup>, Marcelo Santos Castilho(PQ)<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. <sup>2</sup>Universidade de São Paulo - Campus São Carlos. <sup>3</sup>Universidade Federal da Bahia.

\*castilho@ufba.br

Palavras Chave: leishmaniose, superóxido dismutase, thermofluor.

### Introdução

As leishmanioses estão entre as principais doenças tropicais negligenciadas do mundo<sup>1</sup>. Apesar do seu impacto social e econômico, o arsenal terapêutico para o tratamento dessa parasitose é limitado<sup>2</sup>. Esse cenário torna evidente a necessidade da identificação e caracterização de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos contra essa enfermidade. Assim como outros tripanossomatídeos, *Leishmania braziliensis*, responsável pela manifestação cutânea da doença, apresenta enzimas dedicadas à proteção do parasita contra o estresse oxidativo decorrente da resposta imune<sup>3</sup>. Entre as enzimas dessa via destaca-se a superóxido dismutase (*LbSOD*). Ensaio *in vitro* para identificação de inibidores dessa enzima (auto-oxidação de pirogalol) tem baixa sensibilidade e por essa razão identificam um grande número de falso-positivos. Visando contornar esse tipo de problema, relatamos a padronização de um ensaio alternativo (Thermofluor®), mais sensível e que não é influenciado por reações de oxidação.

### Resultados e Discussão

A triagem de inibidores de *LbSOD* depende da obtenção de grandes quantidades de enzima purificada e homogênea. Essa exigência foi alcançada através da clonagem do gene *sod* (GENBANK: 154343218) no vetor de expressão pET M11, utilizando o sistema LIC (Ligation-independent cloning), expressão da enzima de interesse em *E. coli* (BL21-DE3) (1mM de IPTG, 16h, a 20°C e agitação constante 180 RPM) e purificação através de cromatografia de afinidade (coluna de Ni-sepharose®) (Figura 1).

A fim de padronizar o novo teste de avaliação biológica, a estabilidade térmica ( $T_m$ ) da enzima na presença de diferentes tampões (pH 5,0-9,0), sais inorgânicos (ex. NaCl,  $(NH_4)_2SO_4$ , KCl), aditivos (ex. glicerol, DTT) e solventes orgânicos (ex. DMSO, ETOH,  $CHCl_3$ ) foi avaliada (Figura 2).

Os resultados obtidos mostram um efeito estabilizante ( $\Delta T_m$  positivo) de NaCl até 400mM. A partir daí, o efeito é menos evidente, provavelmente devido ao efeito *salting-out*. Os dados evidenciam

também que *LbSOD* é estável em até 5% de  $CHCl_3$ /DMSO.

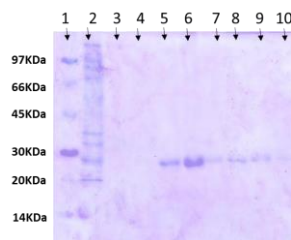


Figura 1. Purificação de *LbSOD* por cromatografia de afinidade. 1: Padrão P.M.; 2: eluato da coluna (Tris-HCl pH 8,0 20mM imidazol); 5-7- Eluição de *LbSOD* (Tris-HCl pH 8,0, 150mM imidazol)

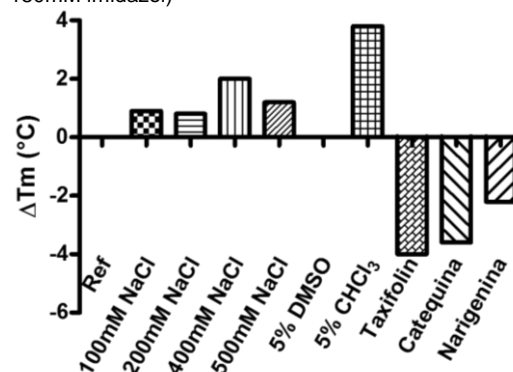


Figura 2: Influência da concentração de NaCl na estabilidade de *LbSOD*. Ref: Tampão 0,1M Tris-HCl pH 7,5.

Finalmente, realizou-se a triagem de 3 derivados de catequina, identificados em ensaios de auto-oxidação de pirogalol como potenciais inibidores de SOD de *Trypanosoma brucei*. A redução no valor de  $T_m$  sugere que efeito observado anteriormente é decorrente da desnaturação da proteína, ou seja, elas são falso-positivos (Figura 2).

### Conclusões

A utilização de ensaios padronizados de triagem por thermofluor® permitiu identificar falso-positivos e assim evitar que esforços químicos medicinais fossem desperdiçados com essa classe de moléculas. Adicionalmente o formato HTS (96 poços) do ensaio permitiu a triagem de mais de 100 produtos de origem natural/sintética até o momento.

### Agradecimentos

FAPESB, CAPES, CNPQ.

<sup>1</sup>Bento, D.B. et al. *Research in Veterinary Science*. 2013.p.1-10.

<sup>2</sup>Fidalgo, L.M.; Gille. *Pharmaceutical Research*. 2011.v.8.n.1.

<sup>3</sup>Gomez; M.A. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 2013.