

# INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS METÁLICOS NA ATIVIDADE DA TRIPANOTIONA REDUTASE EM TRIPANOSSOMATÍDEOS: ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE TERAPIAS CONTRA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE

Palavras-Chave: Alvos Terapêuticos-1, Tripanossomatídeos-2, Metal-Compostos-3

Autores(as):

Bruna Eduarda Siqueira Da Silva, FCF – UNICAMP

Vitor Klipel Da Silva Bertolini, IB - UNICAMP

Natália Fernanda Bueno, IB- UNICAMP

Prof. Dr. Leonardo Talachia Rosa, IB- UNICAMP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camilla Abbehausen (co-orientadora), IQ-UNICAMP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Ramos Gadelha (orientadora), IB- UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO:

Dentre as 22 doenças consideradas como Doenças Tropicais Negligenciadas segundo a Organização Mundial da Saúde, a Doença de Chagas e a Leishmaniose são parasitoses particularmente relevantes no cenário brasileiro [1]. Em relação a profilaxia e tratamento, a doença de Chagas ainda carece de uma vacina ou de um tratamento terapêutico mais efetivo na fase crônica e com menos efeitos colaterais. No caso da leishmaniose, os medicamentos são formulações parenterais tóxicas e com muitos efeitos adversos que podem apresentar eficácia relativa em alguns casos [2,3].

Neste contexto, estudos com metalo-composto surgiram como alternativa para o desenvolvimento de fármacos anti-tripanosomatídeos mais eficazes e menos tóxicos. Os compostos de ouro vêm sendo amplamente estudados, apresentando resultados promissores por terem atividades anti-tumoral, anti-parasitária e anti-microbiana [3,4]. Os complexos utilizando Au<sup>I</sup> são altamente tiofílicos, apresentando assim alta afinidade por grupos sulfidrilas de proteínas, inibindo principalmente enzimas que regulam o sistema redox, como tripanotiona redutase (TR) em tripanossomatídeos [4]. Portanto, o presente projeto tem por objetivo expressar e purificar a tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* (LITR) para posterior avaliação da sua atividade frente a metalo-compostos.

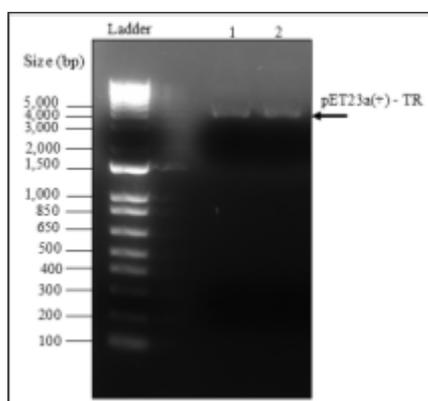
## METODOLOGIA:

**1. Metalo compostos** - Os compostos foram sintetizados no laboratório da Prof<sup>a</sup>. Camilla Abbehausen por métodos previamente estabelecidos e adaptados pelo grupo de pesquisas [3,5].

**2. Expressão heteróloga e purificação da LiTR recombinante** - O plasmídeo pET23a(+) contendo o gene da LiTR (trityp ID: LINF\_050008500) nos foi cedido pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Maria Tomás da Universidade do Porto, Porto, Portugal [6]. A transformação, expressão e a purificação da TR foram realizadas conforme descrito anteriormente [6,7] através de um sistema de cromatografia líquida ÄKTA-Go<sup>®</sup>.

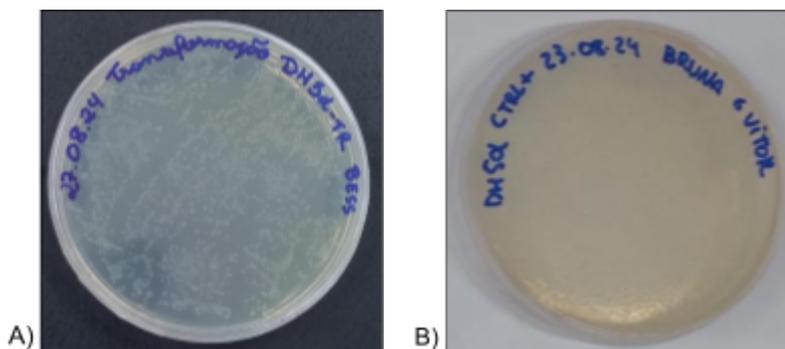
## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A Figura 1 está representada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% para confirmar o peso molecular e a integridade do plasmídeo (**Figura 1**).



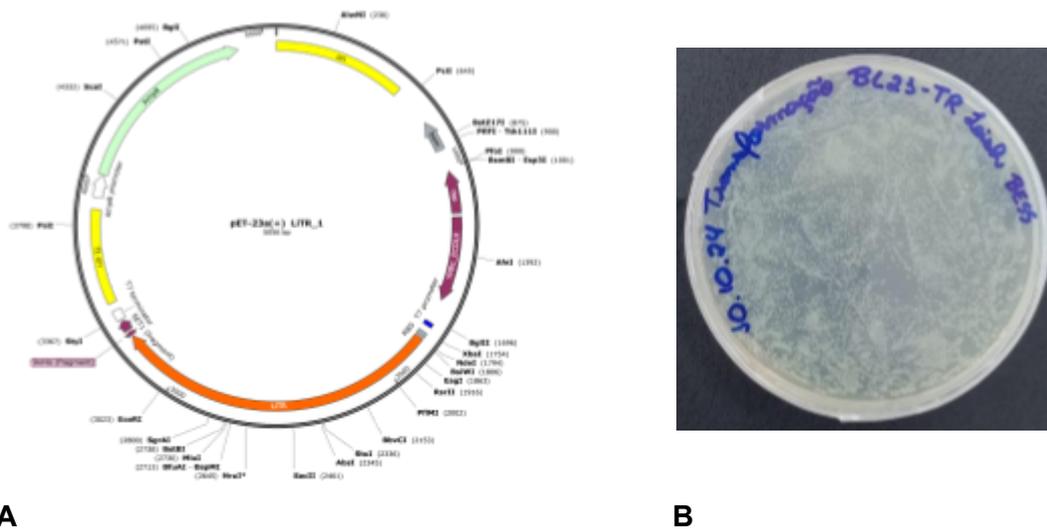
**Figura 1:** Gel de agarose 1,5% com o plasmídeo pET23a(+) contendo a sequência da LiTR. Lane 1 e 2 correspondem ao plasmídeo.

Utilizamos um desses vetores para transformar bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) da linhagem DH5 $\alpha$  para multiplicar o plasmídeo recombinante. A seleção de transformantes por estes vetores ocorreu por meio do gene de resistência à ampicilina. A eficiência que obtivemos na transformação foi muito alta, ou seja, obtivemos um grande número de colônias e tivemos que ajustar as concentrações do vetor utilizado e o tempo de choque térmico. O vetor pUC57 foi utilizado como controle positivo das nossas transformações, assegurando que nosso protocolo de transformação estava adequado para nossas condições (**Figura 2-B**) (**Figura 2-A**) [7].



**Figura 2:** (A) Transformação da DH5 $\alpha$  com o pET23a(+) - LiTR. (B) Transformação da DH5 $\alpha$  com o pUC57, utilizado como controle positivo;

Duas colônias transformadas foram selecionadas para o isolamento do plasmídeo e seu sequenciamento (**Figura 3A**). O resultado do sequenciamento indicou que o Open Reading Frame Finder (ORF) que codifica o gene da LiTR (em laranja) tinha 1.473 pb e codificava 491 aminoácidos. Em ambos os sequenciamentos, alcançamos uma massa molecular de 53 kDa para a TR, que está de acordo com o esperado (trityp ID: LINF\_050008500). Portanto, escolhemos uma das colônias, no caso a primeira, para seguir com os experimentos.

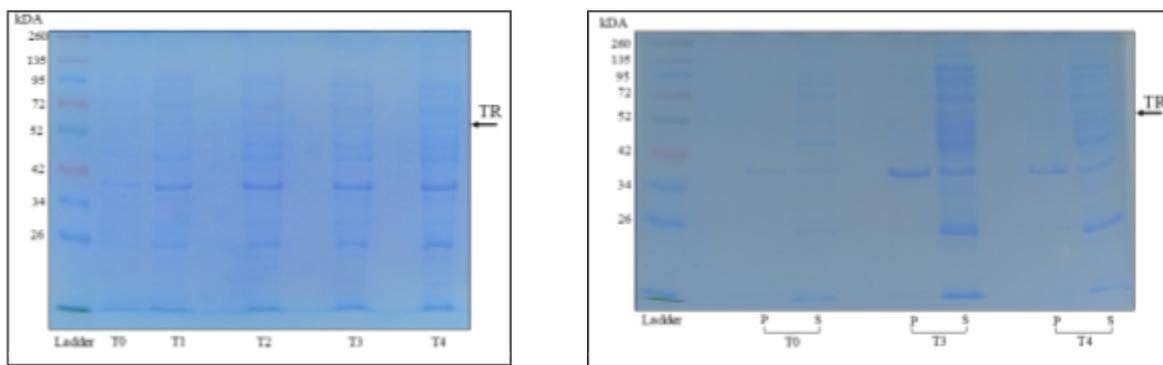


**Figura 3 - (A)** Sequenciamento do plasmídeo isolado, onde o gene da TR está destacado em laranja. **(B)** Transformação da BL21(DE3) com o plasmídeo da TR de *Leishmania infantum*.

Após a confirmação da presença da sequência da TR no plasmídeo, utilizamos o vetor para transformarmos a linhagem BL21(DE3) a fim de expressar nossa proteína de interesse (**Figura 3B**). O protocolo de transformação utilizado foi o mesmo usado anteriormente [7].

A fim de identificarmos o melhor tempo para a expressão da nossa proteína, realizamos um teste de expressão (**Figura 4A**). O experimento foi repetido três vezes, variando a concentração de células, devido a baixa expressão, mas o resultado foi o mesmo. Deste modo, ao compararmos os tempos T0 (utilizado como controle) e T4, nota-se a presença de uma tênue banda na região correspondente ao peso molecular de 52 kDa [4]. Demonstrando que a TR está sendo um pouco melhor expressa em T4 (**Figura 4A**).

A partir disso, realizamos teste de solubilidade com os melhores tempos de expressão, T3 e T4 a fim de identificarmos se a proteína estava na porção insolúvel (*pellet*) ou na fração solúvel (sobrenadante) (**Figura 4B**). A presença de bandas de aproximadamente 52 kDa na fração do sobrenadante indicou que a proteína está na fração solúvel e não foi precipitada durante o processo, correspondendo com o esperado [1].

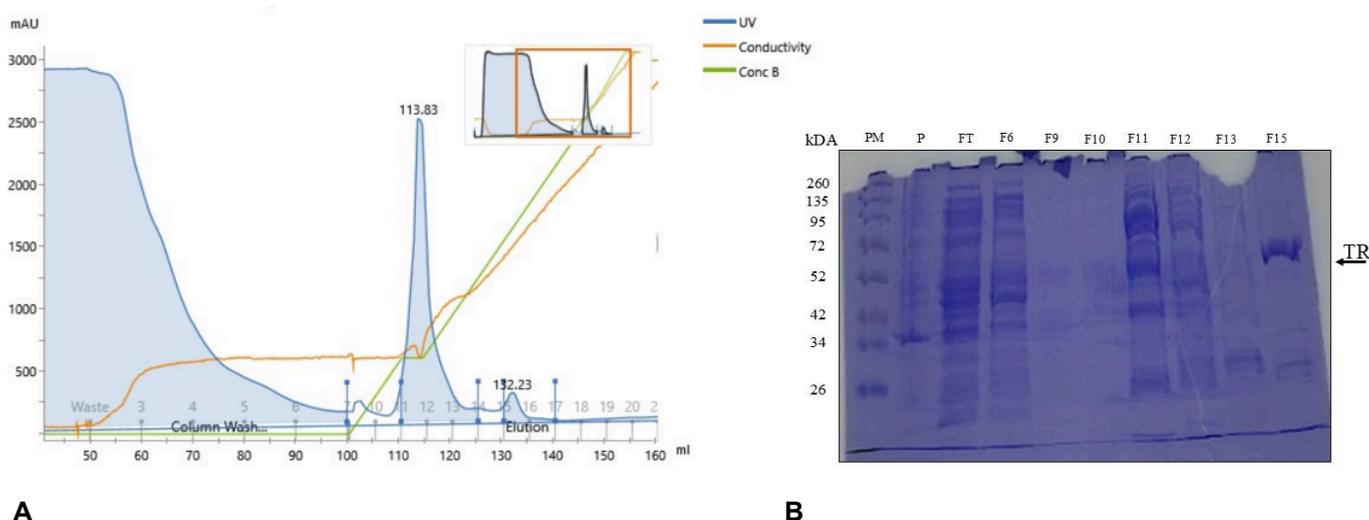


**A**

**B**

**Figura 4 - (A)** Teste de expressão - SDS-PAGE 12%. Ladder: Spectra™ Multicolor *Broad Range Protein Ladder*; T0: Tempo zero, utilizado como controle; T1: uma hora; T2: duas horas; T3: três horas; T4: quatro horas. **(B)** Teste de solubilidade - SDS-PAGE 12%. T0: Tempo zero, utilizado como controle; T3: três horas; T4: quatro horas; P: pellet; S: sobrenadante.

Em seguida, a partir de 2L de cultura, indução com o IPTG por 4h, purificamos a TR inicialmente por uma coluna His **(Figura 5)**.

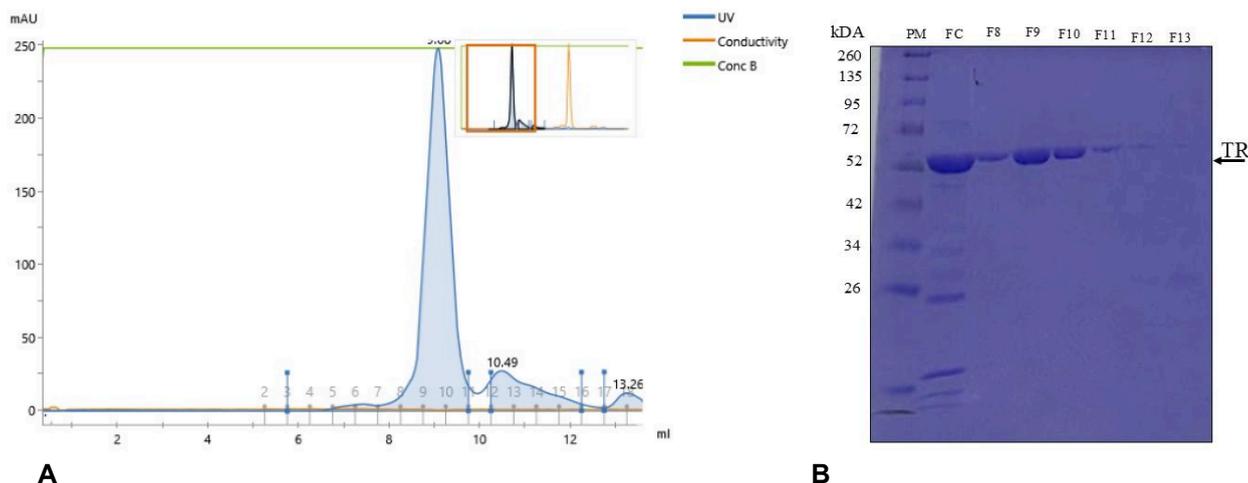


**A**

**B**

**Figura 5 - Cromatografia por afinidade (-His tag) e SDS-PAGE das frações - (A)** Gráfico representativo do perfil proteico do sobrenadante obtido após a sonicação. **(B)** SDS-PAGE das frações: PM - peso molecular; P - pellet; FT - fração total; e demais frações (F).

A partir da análise do SDS-PAGE observamos que o pico maior do gráfico (frações F11-13) continha a nossa proteína, mas também muitos contaminantes. A fração mais pura da nossa proteína correspondia a F15. Prosseguimos com a purificação agora através de uma coluna de gel filtração **(Figura 6)**.



**Figura 8 - Gel filtração - (A)** Gráfico representativo do perfil proteico **(B)** SDS-PAGE das frações: PM - peso molecular; FC - fração inicial; F8-F13 correspondem às respectivas frações no gráfico.

## CONCLUSÕES:

O desenvolvimento deste projeto possibilitou a padronização da purificação da LiTR, o que nos permitirá analisar o efeito dos metalofármacos na atividade da enzima comparando com a atividade da enzima determinada nos parasitas de ambos os gêneros de tripanossomatídeos.

## BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Neglected tropical diseases (NTDs). Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1)> . Acesso em: 21.07.2025.
2. FIOCRUZ. Drogas Tripanossomicidas. Portal da Doença de Chagas. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/>. Acesso em: 21.07.2025.
3. Rosa, L. B, et al 2021. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202100022>.
4. Rosa, L B, et al 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111726>
5. Abbehausen, C, et al 2016. <http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Jinorgbio.2016.05.011>.
6. Inacio, J. D. F., et al 2021. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.640561>
7. Rosa LT. 2018. <https://etheses.whiterose.ac.uk/id/eprint/21307/7/Thesis-LTR-2018-final.pdf>.