



Universidade de São Paulo

Instituto de Química de São Carlos



## Monografia

Identificação de compostos moduladores da proteína Hsp90 de  
*Leishmania braziliensis*

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

Aluno: Sergio Luiz Ramos Junior

nº USP: 7564670

06 de junho de 2016

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Júlio César Borges, pela oportunidade, pela orientação, pela atenção e por sempre me cobrar sorrindo.

A minha amada Ana Paula, pelo companheirismo e amor sem limites.

A minha família por ter me apoiado durante toda a minha graduação.

A Dra. Fernanda Batista (Fer), por toda a orientação, conselhos, ajuda constante e risadas.

A Vanessa Kiraly (Van) pelos infinitos galhos quebrados e pelos cafés.

A todos membros do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas por tornarem os dias mais leves e divertidos.

Ao professor Dr. Andrei Leitão por ceder o espaço do Laboratório de Ensaios Celulares (LabECel) e o material para os testes *in vivo*.

Ao Prof. Dr. Maurizio Botta da Università degli Studi di Siena da Itália pela seleção e fornecimento dos compostos por *virtual screening* que foram testados neste trabalho.

A FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada que atinge milhares de pessoas causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. Em seu ciclo de vida o parasito enfrenta diversas mudanças de ambiente, principalmente quando da passagem do inseto vetor para o hospedeiro mamífero. As chaperonas moleculares e/ou proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*) são essenciais pois auxiliam na manutenção da funcionalidade de diversas proteínas frente ao estresse celular sofrido pelo parasito durante seu ciclo de vida. Dentro desta classe de proteínas, a Hsp90 é a mais expressa no parasito, sendo vital para sua sobrevivência. Com isto, no presente trabalho analisou-se compostos capazes de modular a atividade da Hsp90 de *Leishmania braziliensis* (LbHsp90), acarretando a morte do parasito. Os compostos tiveram a atividade leishmanicida verificada e posteriormente sua interação com as construções completa e N-terminal das Hsp90 humana e de *Leishmania* foi averiguada através da técnica de *quenching* de triptofano. Dos 27 compostos testados, o composto nomeado Glb27 foi o que apresentou a maior afinidade pela Hsp90, sendo responsável por promover uma tênue inibição da atividade ATPásica das Hsp90 de ambas espécies.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease that affects thousands of people caused by the *Leishmania spp* protozoan. In its life cycle, the parasite faces various environmental changes, particularly at the transition from the insect vector for the mammalian host. The molecular chaperones and/or heat shock proteins have great importance assisting and maintaining the functionality of client proteins due to cellular stress suffered by the parasite during its life cycle. Within this class of proteins, Hsp90 is the most expressed in the parasite, and it is vital for their survival. Therefore, the present study analyzed compounds capable to modulate the Hsp90 activity of *Leishmania braziliensis* (LbHsp90), causing its death. The compounds were tested for its leishmanicidal activity and then had their interaction with the complete and N-terminal constructions of human and Leishmania Hsp90 measured by tryptophan quenching technique. From the 27 compounds tested, the compound named Glb27 showed highest affinity for Hsp90, responsible for promoting a slight inhibition of ATPase activity of Hsp90 of both species.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo ATPase da Hsp90 .....	9
Figura 2 - Fluxograma geral das atividades realizadas.....	11
Figura 3 –Atividade Leishmanicida dos compostos testados na concentração de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	18
Figura 4 – Gráfico concentração-resposta para os compostos Glb15, Glb16, Glb23 e Glb25, contra a forma promastigota de <i>L. braziliensis</i> .....	19
Figura 5 - Gráfico concentração-resposta para os compostos Glb8, Glb14, Glb17 e Glb27, contra a forma promastigota de <i>L. braziliensis</i> .....	20
Figura 6 - Gráfico concentração-resposta para os compostos Glb14, Glb23, Glb25 e Glb27, contra fibroblastos de camundongo Balb-C 3T3 clone A31 .....	21
Figura 7 - Gráfico concentração-resposta para os compostos Glb8, Glb15, Glb16 e Glb17 contra fibroblastos de camundongo Balb-C 3T3 clone A31 .....	22
Figura 8 - Domínios N-terminais de duas hHsp90 superpostos, exibindo em sticks vermelhos o triptofano, em sticks azuis a Geldanamicina (PDB: 1YET) e em verde o ATP (PDB: 3TOZ) .....	24
Figura 9 - Espectro de Emissão de Fluorescência de 300 a 420 nm da proteína LbHsp90N em concentrações crescentes do composto Glb17 e seus respectivos brancos (obtidos na ausência da proteína) .....	25
Figura 10 - Espectro de Emissão de Fluorescência de 300 a 420 nm da proteína LbHsp90N em concentrações crescentes do composto Glb8 e seus respectivos brancos (obtidos na ausência da proteína) .....	26
Figura 12 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb15 com as diferentes proteínas testadas .....	28

Figura 11 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb08 com as diferentes proteínas testadas .....	28
Figura 13 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb17 com as diferentes proteínas testadas .....	29
Figura 14 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb23 com as diferentes proteínas testadas .....	29
Figura 15 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb25 com as diferentes proteínas testadas .....	30
Figura 16 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb27 com as diferentes proteínas testadas .....	30
Figura 17 - Alinhamento da sequência primária correspondentes ao domínio N terminal da proteína Hsp90 humana e de <i>L. braziliensis</i> . Em amarelo estão destacados os resíduos W157 e W147 das proteínas humana e de <i>L. braziliensis</i> , respectivamente.....	32
Figura 18 - Inibição da atividade ATPásica para a proteína hHsp90 a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em presença do composto Glb27.....	33
Figura 19 - Inibição da atividade ATPásica para LbHsp90 a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em presença do composto Glb27.....	34
Figura 20 - Duplo Recíproco da proteína hHsp90 na ausência e na presença do composto Glb27 .....	35
Figura 21 - Duplo Recíproco da proteína LbHsp90 na ausência e na presença do composto Glb27 .....	36
Figura 22 - Possibilidade de entrada do inibidor em sítio distinto ao ATP durante o ciclo da atividade ATPase da proteína .....	38
Figura 23 - Fluxograma completo das atividades realizadas.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de indução das proteínas utilizadas .....	14
Tabela 2 - Tampões utilizados para equilibrar a coluna de Gel Filtração e eluição da proteína. .....	15
Tabela 3 - Coeficientes de Extinção Molares das proteínas estudadas .....	16
Tabela 4 - IC <sub>50</sub> obtidos para os compostos contra a forma promastigota de <i>Leishmania</i> .....	20
Tabela 5 - Valores de IC <sub>50</sub> para as células de <i>Leishmania</i> , Fibroblastos de Camundongo e valores do índice de seletividade obtidos para os compostos Glb8, Glb14, Glb15, Glb16, Glb17, Glb23, Glb25 e Glb27 .....	23
Tabela 6 - Valores de K <sub>Dapp</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ) obtidos para cada composto e proteína.....	31
Tabela 7 - Constantes obtidas pela equação de Michaelis-Menten para as proteínas em presença do composto Glb27.....	34

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Materiais e Método.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1 Ensaios Celulares.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.1.1 Atividade Leishmanicida .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.1.2 Determinação da IC<sub>50</sub>.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1.3 Determinação da Citotoxicidade e Índice de Seletividade .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2 Ensaios com a Proteína Alvo .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.2.1 Expressão e Purificação .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.2.2 Supressão de Fluorescência de Triptofano (<i>Quenching</i>).....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.2.3 Inibição de Atividade ATPásica .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Resultados e Discussão .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.1 Ensaios Celulares.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.1.1 Atividade Leishmanicida .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.1.2 Determinação da IC<sub>50</sub>.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1.3 Determinação da Citotoxicidade e Índice de Seletividade .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2 Ensaios com a Proteína Alvo .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.2.1 Supressão de Fluorescência de Triptofano (<i>Quenching</i>).....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.2.2 Inibição de Atividade ATPásica .....</b>	<b>32</b>
<b>3 CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que atinge principalmente a população mais carente de países subdesenvolvidos, onde 350 milhões de pessoas são consideradas em risco de contrair a doença e 2 milhões de novos casos ocorrem a cada ano (Who, 2007). A doença possui três tipos distintos de manifestação, a cutânea, que se caracteriza por lesões na pele principalmente em áreas descobertas do corpo, a mucocutânea, onde tais lesões atingem mucosas e cartilagens e a forma visceral, que é uma doença sistêmica acometendo órgãos internos. De todas as formas a visceral pode ser letal, levando a óbito de 20 a 50 mil pessoas ao ano. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) dos 98 países onde a doença ocorre, o Brasil está entre os 6 que somam 90% dos casos.

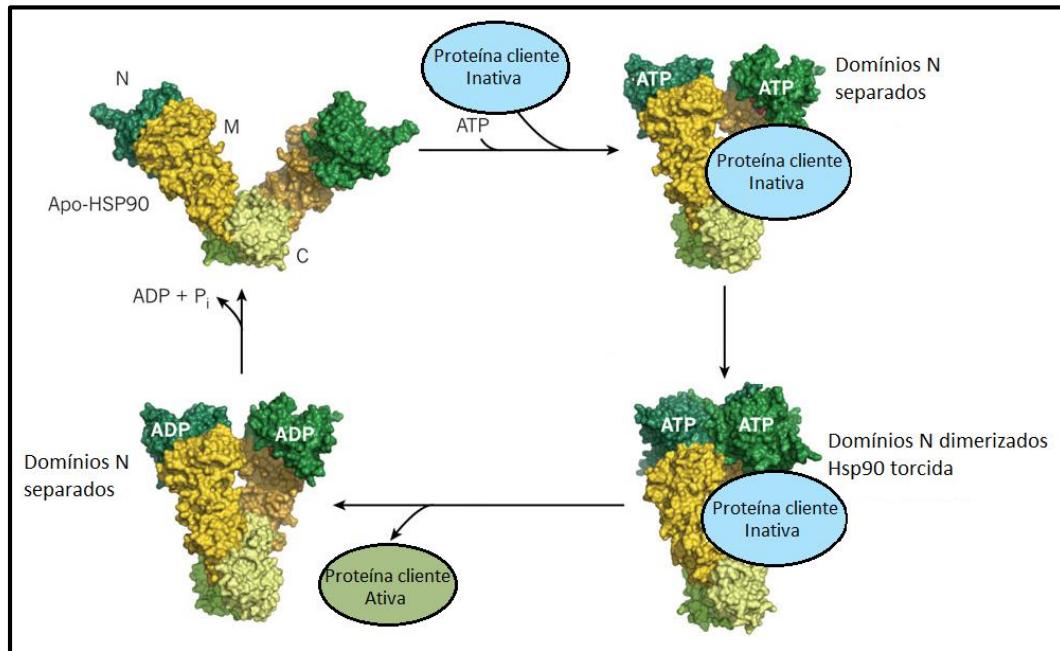
A *Leishmania braziliensis* apresenta sua forma promastigota flagelada nos insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Quando o hospedeiro mamífero é picado, as células do sistema imune fagocitam o protozoário, o que acarreta sua mudança para a forma amastigota infectiva. Esta mudança é induzida por alterações ambientais de temperatura e pH, e as chaperonas moleculares da família Hsp90 desempenham papel na transformação do parasito (Wiesigl e Clos, 2001).

A *Heat shock protein* de 90 kDa (Hsp90) é uma chaperona molecular que possui como principal função auxiliar as proteínas a atingirem seu enovelamento correto (Borges e Ramos, 2005). A Hsp90 forma homodímeros, no qual cada protômero há 3 domínios, N-terminal, M e C-terminal. O domínio N-terminal possui aproximadamente 25 kDa e é responsável pela ligação ao ATP, este domínio, liga-se a um *linker* flexível que por sua vez liga-se ao domínio M (Pearl e Prodromou, 2006; Li *et al.*, 2012). O domínio M possui aproximadamente 35 kDa, nele estão contidos os sítios onde ocorrem as ligações com as proteínas cliente e co-chaperonas. Finalmente o domínio C-terminal é responsável pela dimerização, e também possui sítios de ligação a proteínas cliente.

As Hsp90 são proteínas flexíveis e possuem um equilíbrio de diferentes estados conformacionais, sabe-se que estes estados têm seu equilíbrio deslocado pela ligação ao ATP e ADP (Southworth e Agard, 2011).

Durante seu ciclo, a Hsp90 liga-se ao ATP adquirindo uma conformação mais fechada e sucessivamente à proteína cliente, a Hsp90 então se assume uma conformação mais torcida havendo uma dimerização transitória entre os domínios N de cada protômero. O ATP é então hidrolisado e a proteína se dissocia da proteína cliente, com a saída do ADP a proteína adquire novamente a conformação aberta conforme Figura 1. O ciclo conformacional da Hsp90 é regulado pela atividade ATPásica cuja função é direcionar o ciclo (Mickler *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012).

Figura 1 - Ciclo ATPase da Hsp90



Fonte: Adaptado de (Hartl *et al.*, 2011)

A Hsp90 é expressa abundantemente na *Leishmania*, chegando a totalizar 2-3% do total de proteínas solúveis, podendo aumentar seu nível de expressão em condições de mudança de temperatura (Brandau *et al.*, 1995; Wandinger *et al.*, 2008). Ela torna-se especialmente

importante quando em situações de estresse celular durante o processo infeccioso e da mudança entre as formas promastigota e amastigota. Dada sua grande importância no ciclo de vida do parasito, estas proteínas são apontadas como potenciais alvos para tratamento deste tipo de infecção (Pallavi *et al.*, 2010; Pizarro *et al.*, 2013).

No presente trabalho, uma série de compostos sintéticos, baseados no sítio de ligação do ATP, mas com grupos farmacofóricos distintos, foram avaliados frente a sua capacidade de modular a atividade da Hsp90 de *Leishmania braziliensis* (LbHsp90), acarretando a morte parasitária.

## 2 DESENVOLVIMENTO

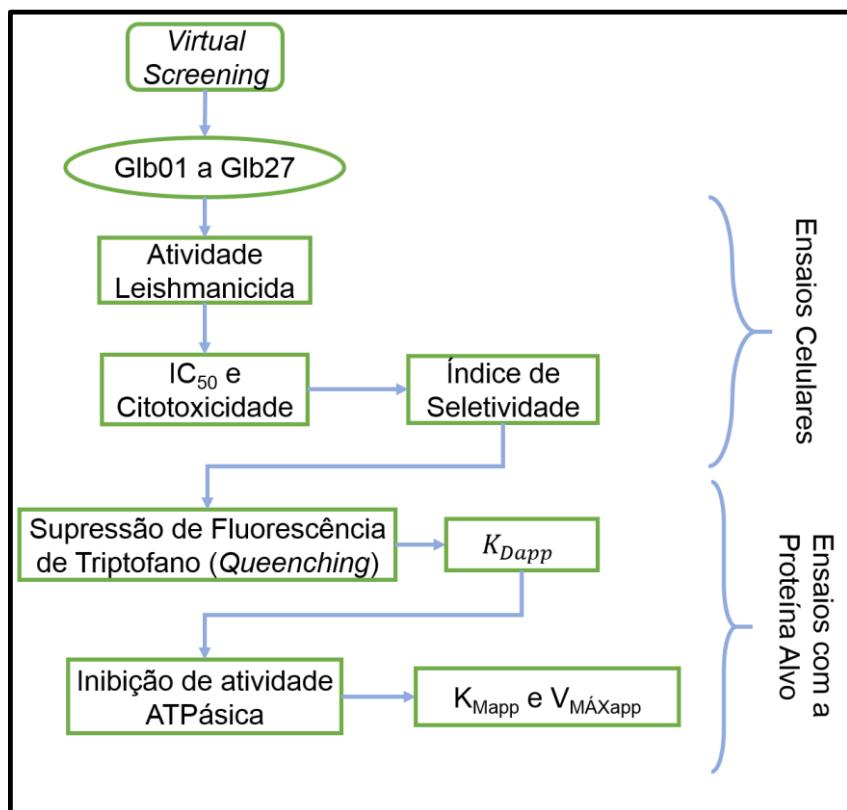
### 2.1 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a identificação de compostos moduladores da atividade da Hsp90 de *L. braziliensis*, dentro de uma série de compostos sintéticos selecionados por *virtual screening*.

### 2.2 Materiais e Método

A partir da seleção por *virtual screening* os compostos passaram por diversos ensaios, tanto celulares quanto com a proteína-alvo. A partir de cada ensaio, averiguou-se os resultados obtidos, selecionando-se os melhores compostos para os testes posteriores, a Figura 2 exibe o fluxograma dos ensaios realizados neste trabalho.

Figura 2 - Fluxograma geral das atividades realizadas



Fonte: Autoria Própria

## 2.2.1 Ensaios Celulares

### 2.2.1.1 Atividade Leishmanicida

O primeiro ensaio realizado foi o de atividade leishmanicida com o intuito de identificar quais compostos possuíam tal capacidade, aqueles que apresentaram baixa ou nenhuma atividade não prosseguiram nos testes. A partir de soluções estoque a 40 mmol L<sup>-1</sup> de cada composto em DMSO, adicionou-se 10 µL a cada poço de uma placa de 96 poços contendo 90 µL de cultura da forma promastigota de *L. braziliensis* previamente ajustada para uma concentração igual a 10<sup>7</sup> células/mL, de modo que a concentração de DMSO em cada poço foi fixada em 0,5% v/v. Anfotericina em concentração final de 100 µmol L<sup>-1</sup> foi adicionada a cada poço como controle positivo. DMSO, à concentração final de 0,5 % v/v, foi utilizado como controle negativo.

O ensaio foi realizado em quadruplicata, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 72 h e após este período realizou-se teste colorimétrico de viabilidade celular com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) adicionando-se 11,1 µL de MTT e metossulfato de fenazina (PMS) solubilizados em PBS a cada poço, incubando-se a 150 rpm protegido da ação da luz. Adicionou-se então a cada poço 100 µL de solução de solubilização contendo 70% dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico (HCl) e 30% de DMSO. Incubando-se a 150 rpm protegido da ação da luz por 90 minutos. A placa então teve sua absorbância em 570 nm medida em um fluorímetro Biotek®.

A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$Viabilidade Celular (\%) = \frac{A_M - A_B}{A_N - A_B} \times 100 \quad (1)$$

onde, A<sub>M</sub> = Absorbância média das amostras, A<sub>B</sub> = Absorbância dos brancos, A<sub>N</sub> = Absorbância do controle negativo.

### **2.2.1.2 Determinação da IC<sub>50</sub>**

Dispensou-se em alíquotas 10 µL de cada composto variando-se a concentração final em cada poço de 1 a 200 µmol L<sup>-1</sup>, mantendo-se fixa a concentração de DMSO a 0,5% v/v por poço em uma placa de 96 poços contendo 90 µL de cultura da forma promastigota de *L. braziliensis* previamente ajustada para uma concentração igual a 10<sup>7</sup> células/mL. Controles positivos e negativos foram utilizados da mesma forma que no ensaio de atividade leishmanicida. As placas foram preparadas em quadruplicata e incubadas a temperatura ambiente por 72h. Por fim procedeu-se um teste colorimétrico de viabilidade celular com MTT. E a partir destes dados, com o auxílio do software GraphPad Prism® construiu-se a curva concentração-resposta por regressão não linear, obtendo-se a concentração capaz de causar a morte de 50% das células do parasito (IC<sub>50</sub>) de cada composto.

### **2.2.1.3 Determinação da Citotoxicidade e Índice de Seletividade**

Uma vez que tanto humanos quanto *Leishmania* possuem Hsp90, foram feitos testes de citotoxicidade com células de fibroblastos de camundongos Balb-C 3T3 clone A31 com intuito de se obter o índice de seletividade, que é a razão entre as IC<sub>50</sub> para as células de mamífero e para o protozoário. Para este teste aliquotou-se 100 µL de meio contendo fibroblasto de camundongo Balb-C 3T3 clone A31, com concentração previamente ajustada para 10<sup>5</sup> células/mL, em uma placa de 96 poços e incubou-se esta placa a 37°C por 24h de modo a permitir a adesão das células. Adicionou-se então 100 µL de composto variando-se a concentração final em cada poço de 1 a 200 µmol L<sup>-1</sup>, mantendo-se fixa a concentração de DMSO a 0,5% v/v, em quadruplicata. Utilizou-se rapamicina como controle positivo e 0,5% v/v de DMSO como controle negativo. Procedeu-se então o ensaio colorimétrico de viabilidade celular idêntico ao anterior com determinação de IC<sub>50</sub> para cada composto. O índice de seletividade foi finalmente calculado através da razão entre as IC<sub>50</sub>.

## 2.2.2 Ensaios com a Proteína Alvo

### 2.2.2.1 Expressão e Purificação

As proteínas recombinantes de *L. braziliensis* foram expressas e purificadas conforme previamente descrito, sendo que as proteínas humanas já possuíam protocolo de expressão e purificação rotineiros no laboratório. Brevemente, todas as proteínas foram expressas na bactéria *Escherichia coli* cepa BL21(DE3) em meio Luria Bertani (LB) contendo o respectivo antibiótico, como apresentado na Tabela 1. A partir de uma cultura inicial, inoculou-se 25 mL em 500 mL de meio de cultura estéril juntamente com o antibiótico correspondente ao plasmídeo utilizado como forma de seleção. Este foi mantido sob agitação em shaker a 37°C e 200 rpm até que a densidade ótica a 600 nm (OD<sub>600</sub>), medida em espectrofotômetro atingisse valor desejado  $0,6 \leq OD_{600} \leq 0,7$ . A produção da proteína foi então induzida pela adição de IPTG em concentração adequada para cada proteína, sendo o meio mantido em temperatura e tempo adequados conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições de indução das proteínas utilizadas

Construção da Proteína	Seleção	IPTG (mmol L <sup>-1</sup> )	T (°C)	Tempo de indução (h)
LbHsp90	Canamicina	0,4	30	4
LbHsp90N	Canamicina	0,4	30	4
hHsp90	Ampicilina	0,4	18	18
hHsp90N	Canamicina	0,4	37	4

Fonte: Autoria Própria

Após o tempo indicado os meios de cultura foram então centrifugados a 8000 rpm descartando-se o sobrenadante e coletando-se o *pellet* da cultura, que pode ser mantido congelado a -20 °C para posterior purificação.

A purificação foi feita em duas etapas cromatográficas para todas as proteínas sendo uma constituída por cromatografia por afinidade com coluna de níquel HisTrap FF (*GE Life Sciences*) e a outra por cromatografia de exclusão por tamanho com coluna Superdex 26/60

(GE® *Life Sciences*), ambas acopladas ao cromatógrafo *AKTA Prime Plus* (GE Healthcare *Lifesciences*).

O *pellet* de 1 L de cultura foi ressuspensionado em 40 mL de Tampão A (Fosfato de Sódio 25 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 25 mM, pH = 7,4) adicionando-se 5 unidades de DNase e 40 µL de lisozima (30 mg mL<sup>-1</sup>) para realizar a lise da membrana celular bacteriana, expondo o meio intracelular que contém a proteína de interesse à fase líquida. O tubo foi mantido em gelo por 40 min e então submetido a ultrassom por 2 min, utilizando-se pulsos de 6 s e intervalo de 60 s a 30% de amplitude no sonicador. Após a sonicação, os lisados foram então centrifugados a 18000 rpm por 30 min descartando-se o *pellet* e filtrando-se o sobrenadante.

As amostras foram então injetadas em frações de 25 mL na coluna de níquel HisTrap FF (GE *Life Sciences*) previamente equilibrada em tampão A com uso de um GE® *Akta Prime Plus*, a 2,5 mL min<sup>-1</sup> e eluiu-se a proteína de interesse com Tampão B (Fosfato de Sódio 25 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, pH 7,4), coletando-se o pico correspondente. Os eluatos da afinidade correspondentes às construções N-terminais das proteínas foram incubados com 40 unidades de trombina por litro de meio de cultura purificado, *overnight*, para clivagem da cauda de histidina. Os eluatos foram então aplicados na coluna de Gel Filtração Superdex 26/60 (GE® *Life Sciences*) equilibrada em tampão correspondente, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Tampões utilizados para equilibrar a coluna de Gel Filtração e eluição da proteína.

Proteína	Tampão	pH
LbHsp90 e LbHsp90N	Tris-HCl 40 mM, KCl 100 mM, β-mercaptoetanol 1 mM	7,4
hHsp90	Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM	8,0
hHsp90N	Tris-HCl 40 mM, KCl 100 mM	7,5

Fonte: Autoria Própria

O pico correspondente à cada proteína foi então coletado e o grau de pureza da proteína foi averiguado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Finalmente, em posse dos respectivos  $\epsilon$ , a concentração da proteína foi determinada por espectrofotometria dada através da Lei de Lamber-Beer,  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ , onde  $A$  = absorbância,  $\epsilon$  = coeficiente de extinção molar e  $c$  = concentração molar do analito, utilizando-se o tampão da gel filtração como branco. Os coeficientes de extinção molares para as proteínas utilizadas estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Coeficientes de Extinção Molares das proteínas estudadas

Proteínas	$\epsilon$ (mol <sup>-1</sup> L cm <sup>-1</sup> )
LbHsp90	57300
LbHsp90N	15930
hHsp90	59250
hHsp90N	17420

Fonte: Autoria Própria

Para a realização dos testes, as proteínas foram dialisadas para tampão Hepes 40 mmol L<sup>-1</sup>, de pH igual ao da purificação, e KCl 100 mmol L<sup>-1</sup>. Para realização dos testes de inibição de atividade ATPásica que necessitam serem feitos em tempo inferior a 24h a proteína foi purificada em seu segundo passo cromatográfico diretamente em tampão HEPES-KCl.

### 2.2.2.2 Supressão de Fluorescência de Triptofano (*Quenching*)

Os testes de *quenching* foram realizados com os compostos Glb8, Glb15, Glb17, Glb23, Glb25 e Glb27. Manteve-se a concentração de proteína constante e igual a 2  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> em presença de concentrações crescentes de composto de 0 a 200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. A concentração de DMSO foi mantida fixa e inferior a 2 % v/v. As amostras foram incubadas por 30 min em gelo e excitadas a 280 nm aferindo-se a intensidade de fluorescência no intervalo de 300 a 420 nm. As análises foram feitas em duplicatas. As medidas foram realizadas em duplicata (exceto para a construção hHsp90N), em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301pc (*Shimadzu Scientific Instruments*), com excitação em 280 nm e emissão entre 300 e 420 nm, à temperatura ambiente e utilizando-se cubeta com 1 cm de passo óptico.

### 2.2.2.3 Inibição de Atividade ATPásica

Em uma placa de 96 poços pipetou-se em duplicatas volumes fixos de 0,74  $\mu\text{L}$  do composto Glb27 a 40 mmol  $\text{L}^{-1}$  em DMSO de modo a manter a concentração de composto fixa a 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em cada poço, adicionando-se então as respectivas proteínas (LbHsp90 e hHsp90) em tampão Hepes (40 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) contendo KCl (100 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) de modo que sua concentração fosse fixa e igual a 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A proteína foi então incubada com o composto por 30 minutos em geladeira de modo a favorecer a interação entre estes. Adicionou-se cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) suficiente para se obter uma concentração final de 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  em cada poço. Pipetou-se então uma curva crescente em concentração de ATP. E incubou-se a placa em estufa à 37 °C por 40 minutos. A medida de fosfato liberado na hidrólise do ATP foi comparada com uma curva fosfato construída em duplicita pela utilização do *kit PiColorLock (Innova Biosciences)*. Para se avaliar a inibição a mesma curva de ATP foi construída simultaneamente com a proteína pura e apenas com DMSO, mantendo-se fixo a concentração de DMSO utilizada na curva com composto, igual a 0,5% v/v. Fez-se a leitura da absorbância da placa no Varioskan® LUX (*Thermo Scientific*), em 650 nm.

## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Ensaios Celulares

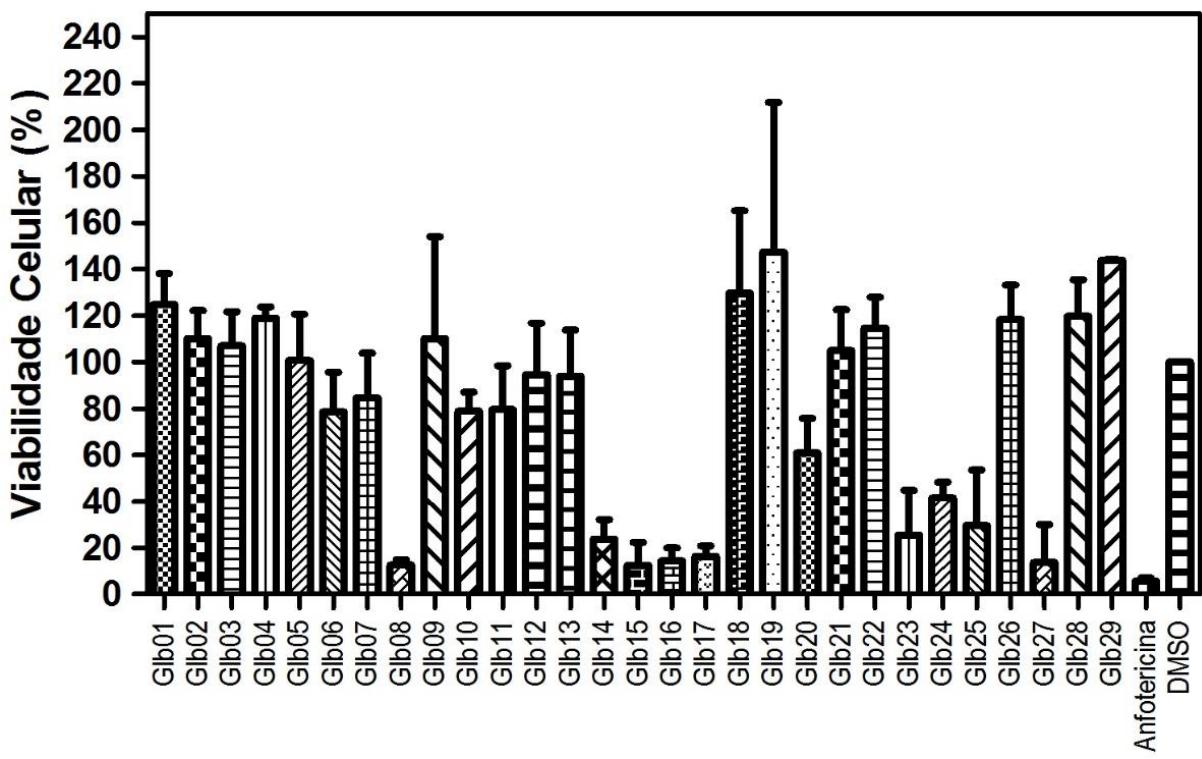
#### 2.3.1.1 Atividade Leishmanicida

Os compostos utilizados foram fornecidos pelo Prof. Dr. Maurizio Botta (Università degli Studi di Siena, Itália), e foram selecionados por *virtual screening* para que se liguem ao domínio N terminal da LbHsp90, mais especificamente no sítio de ligação do ATP, potencialmente inibindo a atividade ATPásica da Hsp90, necessária para o desenvolvimento de sua função no meio celular (Panaretou *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2013).

A capacidade dos compostos de promover a morte parasitária se deu através da técnica que tem por princípio a absorção do anel tetrazólio do MTT por células vivas. Dentro das células o composto MTT de cor amarelada teve seu anel tetrazólio clivado pela ação de enzimas desidrogenases com consequente formação de formazana, que é insolúvel e possui coloração púrpura. O sal de formazana é então solubilizado e tem sua absorção lida de modo que quanto maior a porcentagem de células viáveis maior será a formação de formazana e a consequente absorção. Desta forma é possível detectar as células vivas com rapidez e precisão, dispensando o uso de isótopos radioativos (Mosmann, 1983). Estes experimentos foram conduzidos pela Dra. Fernanda Aparecida Heleno Batista, pós-doutoranda do grupo BBP.

A partir dos valores obtidos construiu-se o gráfico da atividade leishmanicida exibido na Figura 3.

Figura 3 –Atividade Leishmanicida dos compostos testados na concentração de  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$



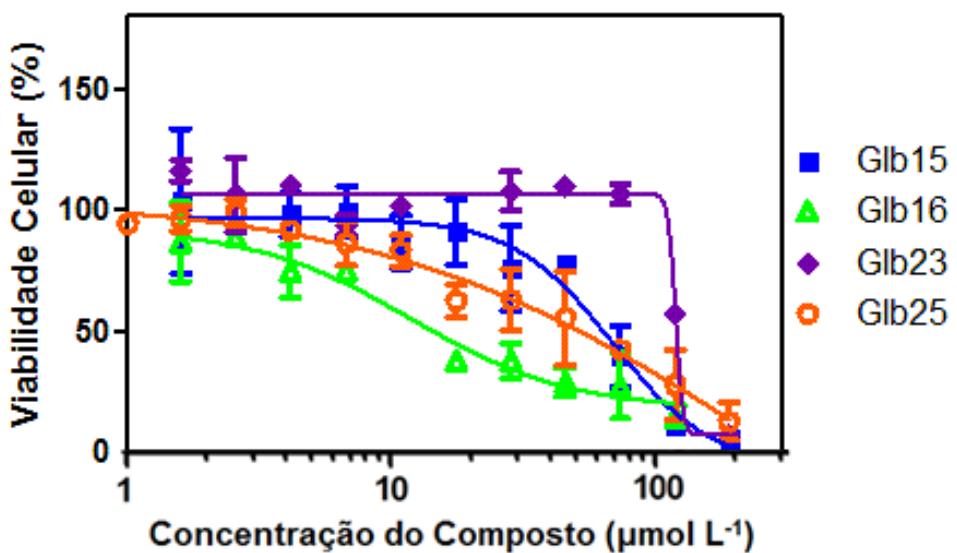
Fonte: Autoria Própria

A partir do gráfico pode-se observar que vários compostos apresentaram atividade leishmanicida contra a forma promastigota de *L. braziliensis*, sendo eles Glb8, Glb14, Glb15, Glb16, Glb17, Glb20, Glb23, Glb24, Glb25 e Glb27. Os compostos Glb8, Glb14, Glb15, Glb16, Glb17, Glb23, Glb25 e Glb27 que promoveram mais de 60% de morte celular e tiveram a IC<sub>50</sub> determinada.

### 2.3.1.2 Determinação da IC<sub>50</sub>

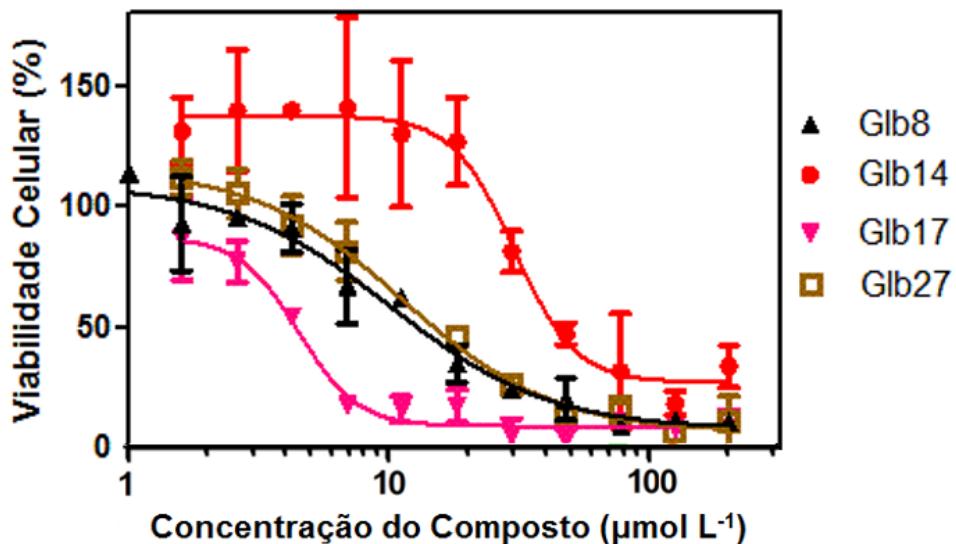
Diferentes concentrações dos compostos Glb8, Glb14, Glb15, Glb16, Glb17, Glb23, Glb25 e Glb27 tiveram sua atividade leishmanicida avaliada contra a forma promastigota de *L. braziliensis* e a partir do ajuste dos dados obtidos para cada composto à uma regressão não linear obteve-se a Figura 4 e a Figura 5, que apresentam as curvas concentração-resposta. Para melhor visualização das curvas elas estão representadas separadas.

Figura 4 – Gráfico concentração-resposta para os compostos Glb15, Glb16, Glb23 e Glb25, contra a forma promastigota de *L. braziliensis*



Fonte: Autoria Própria

Figura 5 - Gráfico concentração-resposta para os compostos Glb8, Glb14, Glb17 e Glb27, contra a forma promastigota de *L. braziliensis*



Fonte: Autoria Própria

A partir da regressão obteve-se os valores de  $\text{IC}_{50}$  dos compostos, expressos na Tabela 4.

Tabela 4 -  $\text{IC}_{50}$  obtidos para os compostos contra a forma promastigota de *Leishmania*

Composto	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
Glb8	$43 \pm 2$
Glb14	$30 \pm 1$
Glb15	$71 \pm 2$
Glb16	$12 \pm 2$
Glb17	$4 \pm 1$
Glb23	$>100$
Glb25	$>200$
Glb27	$11 \pm 1$

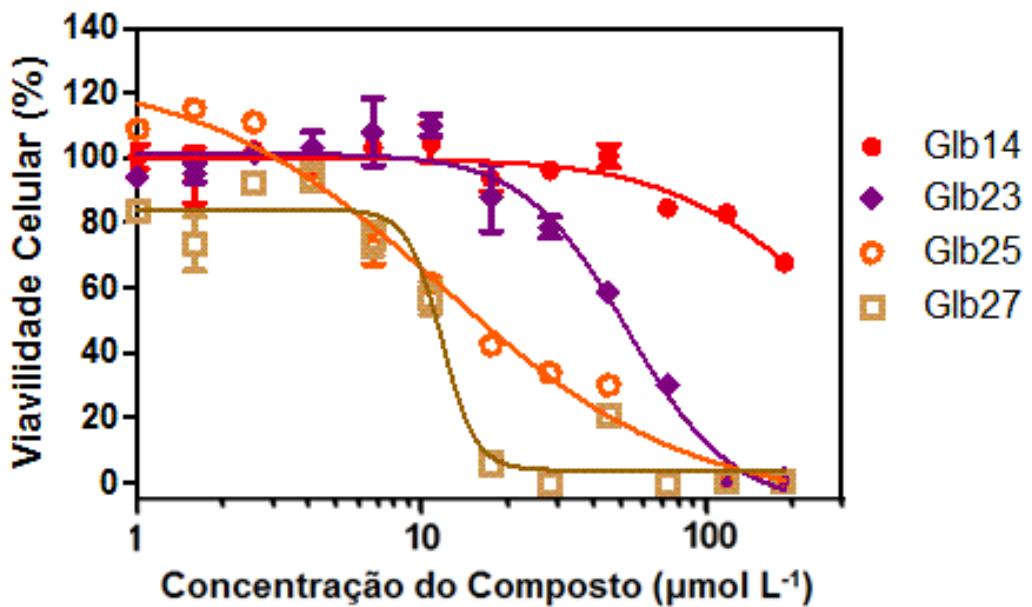
Fonte: Autoria Própria

Baseado nos resultados apresentados nas figuras anteriores e Tabela 4 observa-se que os compostos Glb8, Glb14, Glb16, Glb17 e Glb27 apresentaram os menores valores de  $\text{IC}_{50}$  sendo  $\leq 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , mostrando-se os mais promissores. Por outro lado, os compostos Glb23 e Glb25 demonstraram pontos dispersos, sendo difícil precisão na regressão e apresentaram, portanto, valores muito altos de  $\text{IC}_{50}$  sendo  $> 100$  e  $> 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

### 2.3.1.3 Determinação da Citotoxicidade e Índice de Seletividade

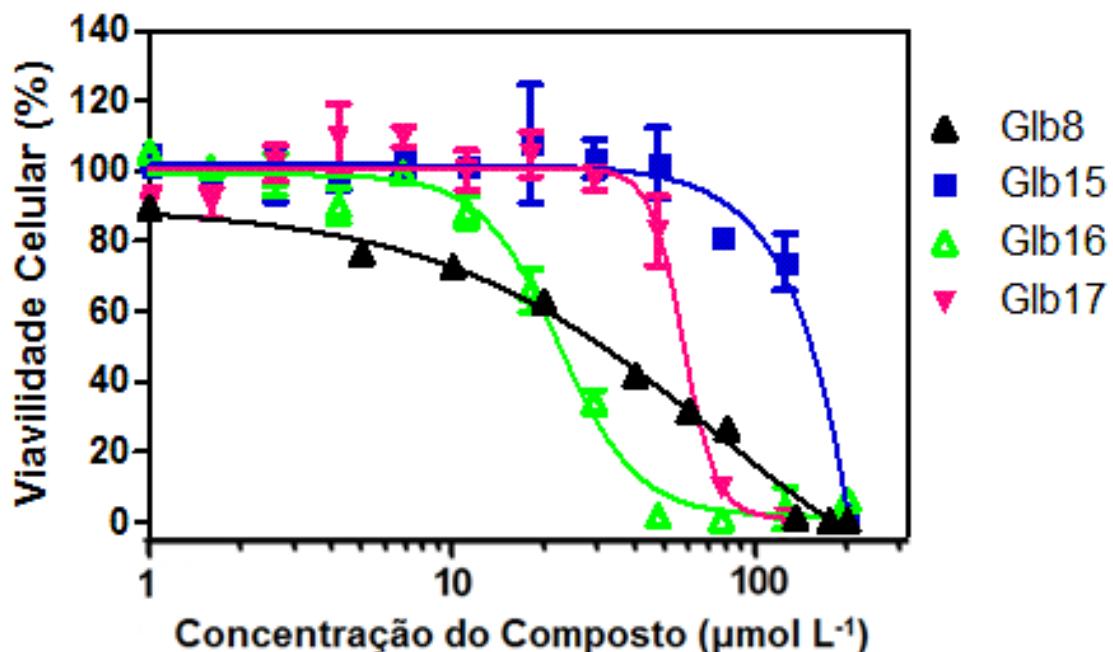
De mesma maneira que no ensaio anterior determinou-se a citotoxicidade dos compostos contra fibroblasto de camundongo Balb-C 3T3 clone A31. Obtendo-se a Figura 6 e a Figura 7, separando-se as curvas para permitir uma melhor visualização.

Figura 6 - Gráfico concentração-resposta para os compostos Glb14, Glb23, Glb25 e Glb27, contra fibroblastos de camundongo Balb-C 3T3 clone A31



Fonte: Autoria Própria

Figura 7 - Gráfico concentração-resposta para os compostos Glb8, Glb15, Glb16 e Glb17 contra fibroblastos de camundongo Balb-C 3T3 clone A31



Fonte: Autoria Própria

A partir das curvas, obteve-se os valores de IC<sub>50</sub> para fibroblastos, expressos na Tabela 5, onde também se encontram os valores dos índices de seletividade, que correspondem a razão  $\frac{IC_{50}_{fibroblasto}}{IC_{50}_{Leishmania}}$ ; uma vez que ambos organismos expressam a Hsp90 é essencial que o provável composto inibidor apresente boa seletividade de maneira que seu funcionamento não afete o organismo humano. Portanto os compostos mais interessantes, do ponto de vista farmacológico, serão os que apresentarem os índices mais elevados, significando que eles são mais seletivos para a proteína do parasito.

Tabela 5 - Valores de IC<sub>50</sub> para as células de *Leishmania*, Fibroblastos de Camundongo e valores do índice de seletividade obtidos para os compostos Glb8, Glb14, Glb15, Glb16, Glb17, Glb23, Glb25 e Glb27

Composto	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <i>L. braziliensis</i>	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) Fibroblasto	Índice de Seletividade
<b>Glb8</b>	43 $\pm$ 2	75 $\pm$ 3	1,7
<b>Glb14</b>	30 $\pm$ 1	>200	>6,7
<b>Glb15</b>	71 $\pm$ 2	>200	>2,8
<b>Glb16</b>	12 $\pm$ 2	23 $\pm$ 1	1,9
<b>Glb17</b>	4 $\pm$ 1	58 $\pm$ 1	14,5
<b>Glb23</b>	>100	55 $\pm$ 1	<0,5
<b>Glb25</b>	>200	11 $\pm$ 1	<0,05
<b>Glb27</b>	11 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	1,2

Fonte: Autoria Própria

De acordo com a tabela, o composto mais seletivo foi o Glb17 (que possui índice >14).

Os compostos Glb23 e Glb25 que apresentaram altos IC<sub>50</sub> contra a forma promastigota de *L. braziliensis* obtiveram como esperados os menores índices de seletividade, esses índices inferiores a 1 demonstram que os compostos são seletivos para células de camundongo, e embora não tenham se apresentado eficazes contra a *Leishmania*, podem ter outras aplicações estudadas, como por exemplo seu potencial antineoplásico.

Os compostos Glb16 e Glb27, apesar de possuírem baixo valor de IC<sub>50</sub> para células de *Leishmania*, apresentaram alta citotoxicidade de modo que seu índice de seletividade são menores que 2.

O Glb14 apresentou potencial leishmanicida próximo ao Glb8, porém com citotoxicidade menor para células de fibroblasto, e por isso possuindo maior índice de seletividade.

O composto Glb15 apresentou baixa atividade leishmanicida, porém também apresentou baixa citotoxicidade (IC<sub>50</sub> > 200).

Ressalta-se que apesar de apenas o composto Glb17 ter apresentado IC<sub>50</sub> > 10, os compostos Glb8 e Glb16 apresentaram IC<sub>50</sub> > 1, podendo servir de base para uma nova geração de compostos.

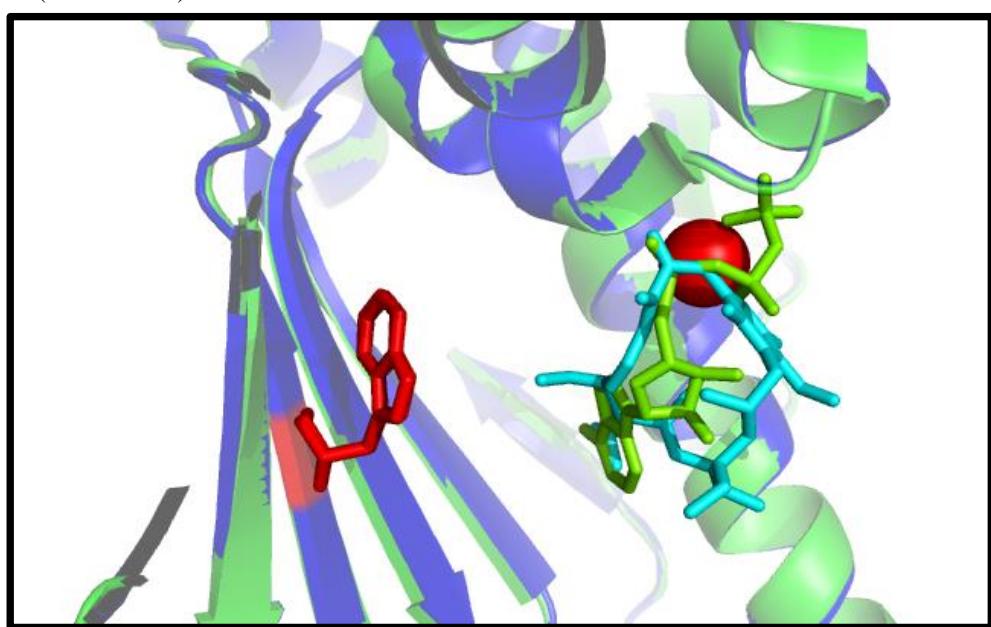
## 2.3.2 Ensaios com a Proteína Alvo

### 2.3.2.1 Supressão de Fluorescência de Triptofano (*Quenching*)

Embora alguns compostos tenham demonstrado atividade leishmanicida, não é possível saber qual é o mecanismo pelo qual esta atividade se deu. Assim, a fim de verificar se a atividade leishmanicida se dá via Hsp90, o primeiro passo consiste em comprovar a interação entre os compostos e a proteína. Tendo isto em vista os testes foram feitos com as proteínas humana e de *Leishmania* com as construções completas e com as construções que constituem apenas o domínio N-terminal, de modo que se possa atestar se há interação e se esta se deu no domínio N-terminal, assim como comparar se esta interação tem maior afinidade com a proteína do parasito do que com a humana.

Esta técnica baseia-se no fato do aminoácido aromático triptofano apresentar o fenômeno de fluorescência. Quando o composto interage com a proteína, ele pode promover alterações no ambiente em que se encontra o triptofano, dada a proximidade do sítio de ligação previsto com o triptofano do domínio N-terminal, como exibido na Figura 8

Figura 8 - Domínios N-terminais de duas hHsp90 superpostos, exibindo em sticks vermelhos o triptofano, em sticks azuis a Geldanamicina (PDB: 1YET) e em verde o ATP (PDB: 3TOZ)



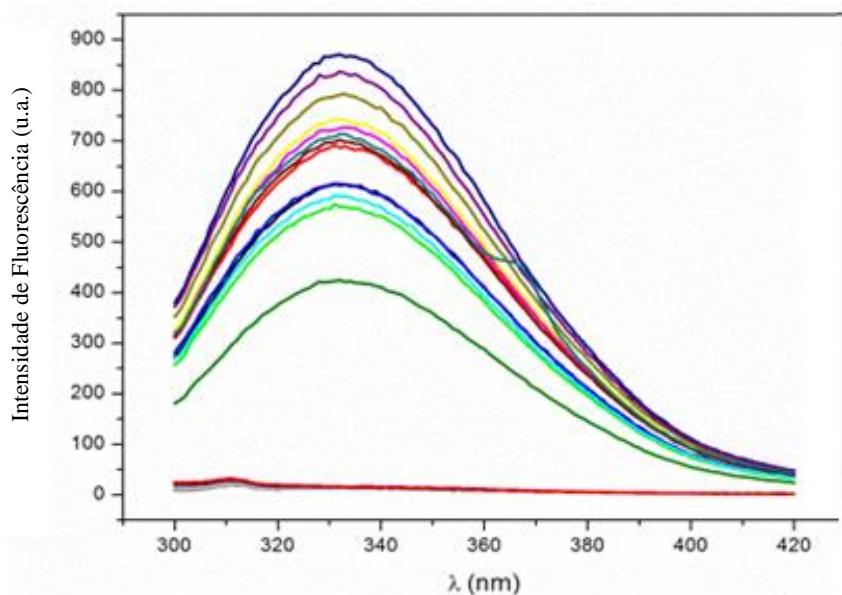
Fonte: Autoria Própria

Esta interação se traduz em mudanças no perfil de fluorescência do triptofano de forma concentração dependente. Isto significa que quanto maior a concentração do composto, maior será o efeito observado sobre a emissão de fluorescência do triptofano. Neste caso, observa-se que havendo interação proteína-composto, haverá redução na intensidade de fluorescência emitida (supressão ou *quenching*), de forma concentração dependente.

De todos os compostos anteriores, apenas Glb14 e Glb16 não puderam ser testados por tal técnica, pois o fato de serem fluorescentes impediu sua avaliação por *quenching* sendo necessária a utilização de outro método para avaliar sua interação com a proteína alvo.

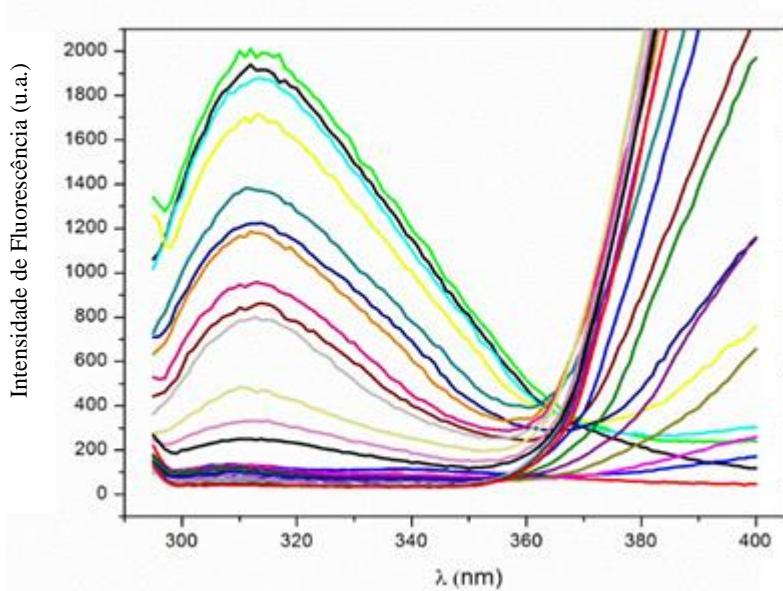
Foram obtidos espectros de emissão de fluorescência para os compostos em presença das respectivas proteínas, e estes espectros foram traçados com o auxílio do *software* Origin®. A Figura 9 e a Figura 10 ilustram o experimento realizado.

Figura 9 - Espectro de Emissão de Fluorescência de 300 a 420 nm da proteína LbHsp90N em concentrações crescentes do composto Glb17 e seus respectivos brancos (obtidos na ausência da proteína)



Fonte: Autoria Própria

Figura 10 - Espectro de Emissão de Fluorescência de 300 a 420 nm da proteína LbHsp90N em concentrações crescentes do composto Glb8 e seus respectivos brancos (obtidos na ausência da proteína)



Fonte: Autoria Própria

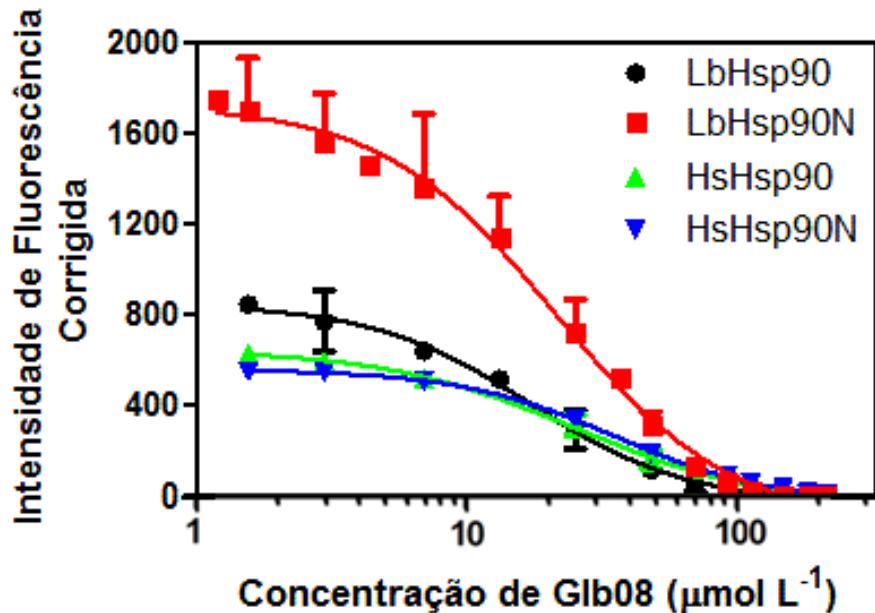
Observa-se na Figura 9 que o composto Glb17 causou pouco *quenching* enquanto que na Figura 10 o composto Glb8 em maiores concentrações chegou a suprimir a fluorescência de tal maneira que o espectro atinge mesma intensidade de fluorescência que os brancos utilizados. A supressão fraca em presença de diferentes concentrações do composto Glb17 sugere que sua atividade leishmanicida pode não estar ocorrendo via LbHsp90, ou que ao se ligar a proteína este composto não acarreta mudanças no ambiente do triptofano, sendo necessário o uso de outras técnicas para se avaliar a interação. Por outro lado, o *quenching* observado para a fluorescência da LbHsp90N em presença do composto Glb8, sugere a interação entre ambos.

Baseado nisto, para determinação das constantes de dissociação aparentes,  $K_{Dapp}$ , dos compostos para cada proteína, fixou-se como base o comprimento de onda onde ocorre o máximo de intensidade de fluorescência, e descontando-se dos respectivos brancos traçou-se a intensidade de fluorescência versus log da concentração do composto. Esta curva foi corrigida pelo efeito de filtro interno pela aplicação da Equação 2 apresentada a seguir.

$$F_{corrigida} = F_{observada} \cdot e^{-2,303(\varepsilon_{emissão} l_{emissão} c + \varepsilon_{excitação} l_{excitação} c)} \quad (2)$$

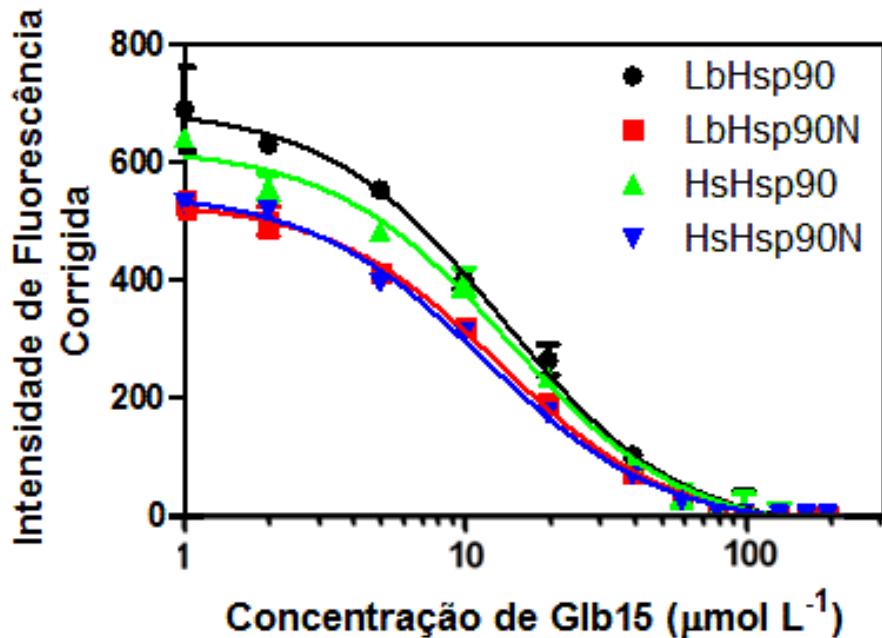
onde  $F_{corrigida}$  = fluorescência corrigida pelo efeito de Filtro Interno;  $F_{observada}$  = fluorescência observada antes da correção;  $\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar respectivamente nos comprimentos de onda de emissão (observado) e de excitação;  $l$  = passo ótico, de emissão e excitação respectivamente;  $c$  = concentração do composto em cada ponto observado. Esta correção se deve ao fenômeno de absorção dos compostos tanto nos comprimentos de onda de excitação como nos de emissão de fluorescência observados. A partir da fluorescência corrigida obteve-se a curva Concentração-Resposta com o auxílio do *software* GraphPad Prism® conforme explicitado nas Figura 12, Figura 11, Figura 13, Figura 14, Figura 15 e Figura 16. Obtendo-se os valores de  $K_{Dapp}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) expressos na Tabela 6.

Figura 12 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb08 com as diferentes proteínas testadas



Fonte: Autoria Própria

Figura 11 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb15 com as diferentes proteínas testadas

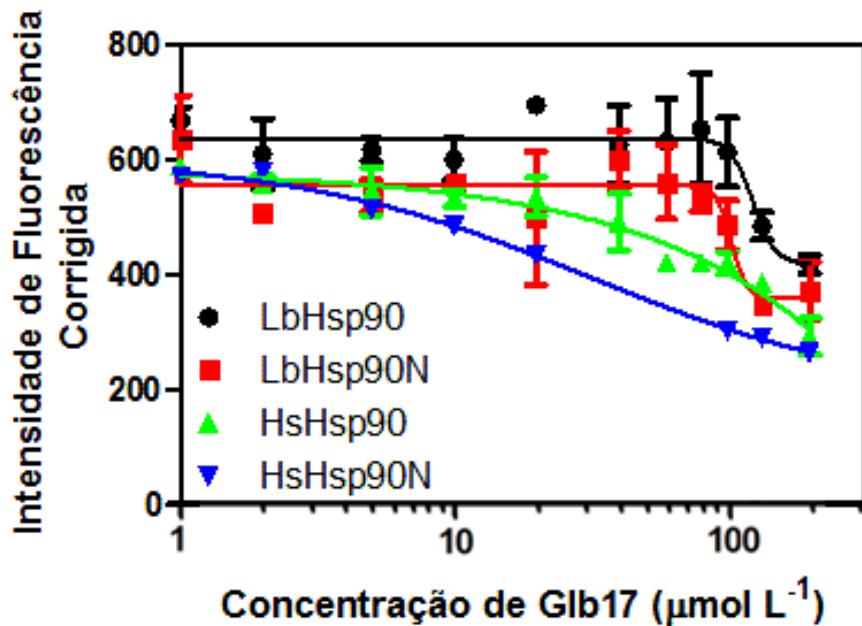


Fonte: Autoria Própria

Os dados experimentais obtidos para os compostos permitem um ajuste adequado de uma curva Concentração-Resposta exceto para o composto Glb17 que pelo baixo *quenching*

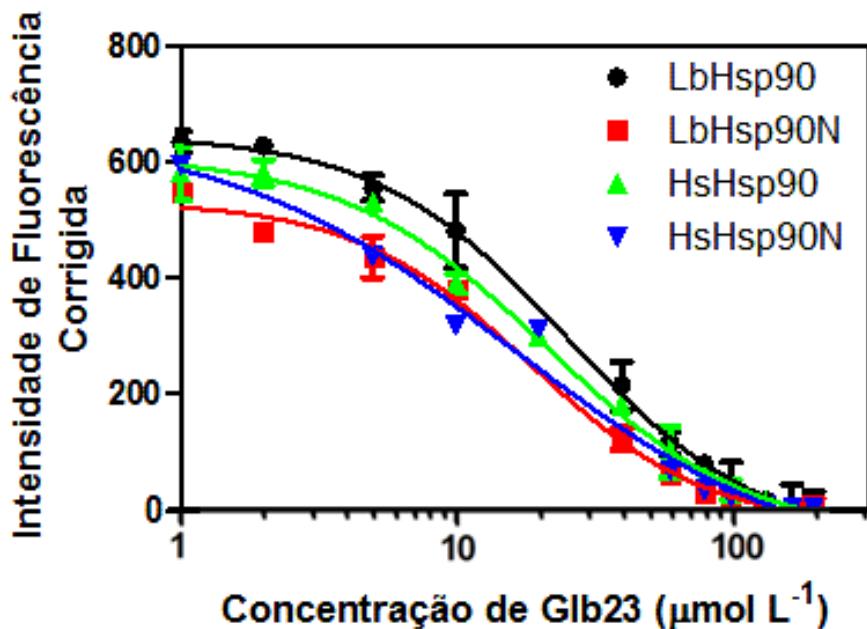
promovido também não permite um cálculo do valor de  $K_{Dapp}$  confiável para as proteínas testadas, como se observa na Tabela 6.

Figura 13 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb17 com as diferentes proteínas testadas



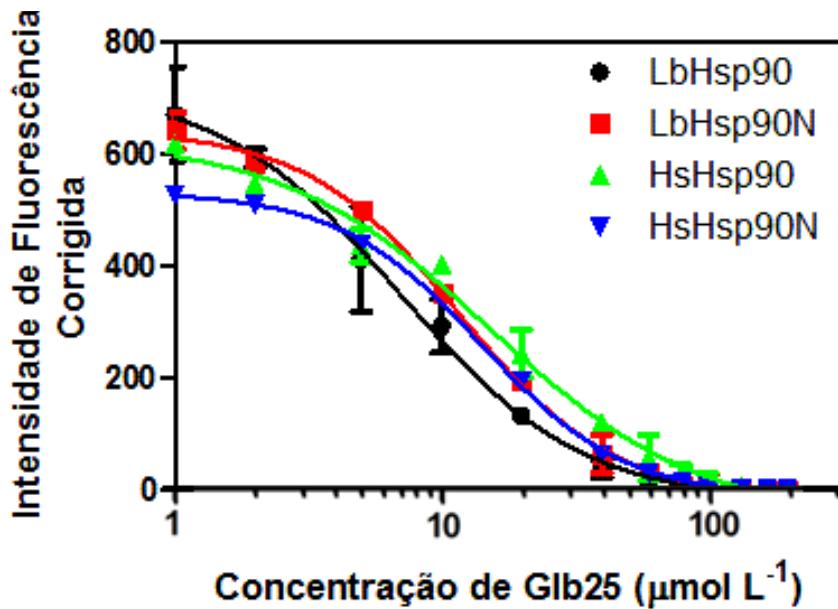
Fonte: Autoria Própria

Figura 14 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb23 com as diferentes proteínas testadas



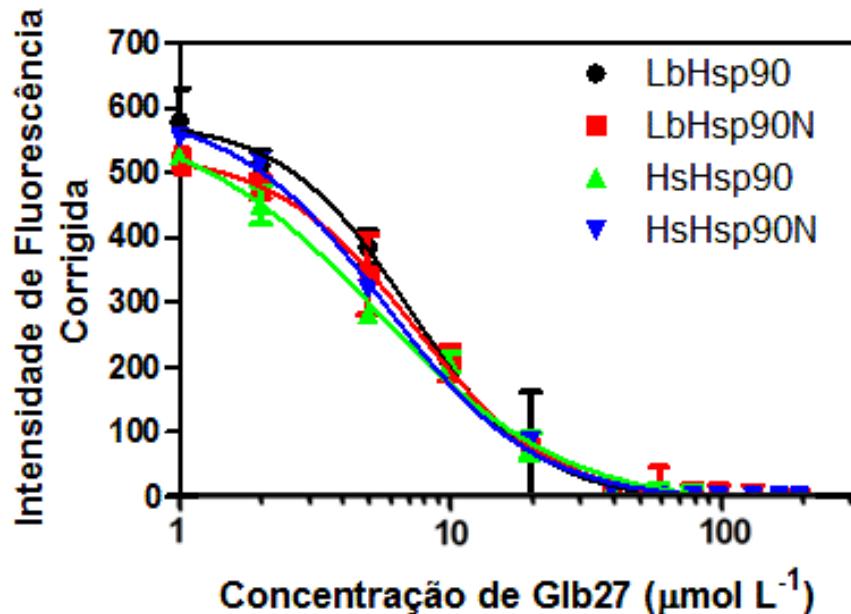
Fonte: Autoria Própria

Figura 15 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb25 com as diferentes proteínas testadas



Fonte: Autoria Própria

Figura 16 - Curva Concentração-Resposta para o composto Glb27 com as diferentes proteínas testadas



Fonte: Autoria Própria

Tabela 6 - Valores de  $K_{Dapp}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) obtidos para cada composto e proteína

Composto	Proteína			
	hHsp90	hHsp90N	LbHsp90	LbHsp90N
<b>Glb8</b>	20 $\pm$ 5	29 $\pm$ 3	13 $\pm$ 4	17 $\pm$ 6
<b>Glb15</b>	14 $\pm$ 6	12 $\pm$ 3	14 $\pm$ 4	13 $\pm$ 3
<b>Glb17</b>	(Ambíguo)	(Ambíguo)	124 $\pm$ 21	104 $\pm$ 67
<b>Glb23</b>	21 $\pm$ 9	16 $\pm$ 30	26 $\pm$ 7	19 $\pm$ 10
<b>Glb25</b>	15 $\pm$ 9	14 $\pm$ 3	7 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2
<b>Glb27</b>	5 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1

Fonte: Autoria Própria

A partir da tabela e dos gráficos observa-se que de modo geral os  $K_{Dapp}$  obtidos são de mesma dimensão ou ligeiramente menores para as construções do domínio N-terminal. Há exceções, porém estas se encontram dentro da faixa de erro obtidas. Essas interações similares entre as construções sugere que a associação ocorre via N-terminal, além disto a construção completa pode apresentar interferências na interação dado o impedimento estérico proporcionado pelos domínios M e C para que o composto interaja com o domínio N (Silva *et al.*, 2013).

O composto Glb17, apesar de apresentar o melhor índice de seletividade, não foi capaz de induzir *quenching* de modo que não se obteve sua  $K_{Dapp}$  para a proteína humana e obteve-se valores da  $K_{Dapp} > 100 \mu\text{mol L}^{-1}$  e com erro considerável para a proteína de *Leishmania spp.* Este fato sugere que sua atividade leishmanicida pode não ocorrer via ação inibitória sobre a LbHsp90.

Os compostos que apresentaram as interações mais fortes foram Glb8 ( $K_{Dapp} = 13 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), Glb25 ( $K_{Dapp} = 7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e Glb27 ( $K_{Dapp} = 7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). No entanto os dois primeiros apresentaram baixos valores de atividade leishmanicida, sendo que o Glb25 apresentou índice de seletividade  $< 1$ .

Infelizmente os compostos não apresentaram grande diferença entre as afinidades pelas proteínas de *Leishmania* e humana, sendo que o Glb23 e Glb27 apresentaram menores  $K_{D_{apps}}$ , ou seja, interações levemente mais fortes com a proteína humana. Isto indica uma baixa especificidade na interação com a proteína do parasito. Embora indesejada, a interação cruzada não é surpreendente dado que o domínio N terminal das espécies humana e *Leishmania* possui 70% de identidade sequencial, de acordo com o apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Alinhamento da sequência primária correspondentes ao domínio N terminal da proteína Hsp90 humana e de *L. braziliensis*. Em amarelo estão destacados os resíduos W157 e W147 das proteínas humana e de *L. braziliensis*, respectivamente

Fonte: Autoria Própria

Por vezes os compostos selecionados podem causar inibição por efeito de agregação no meio, para se confirmar o resultado obtido, pode-se testar em presença de detergente (e.g. 0,1% Triton X-100) pois o detergente ao diminuir a tensão superficial impede o efeito de agregação, e caso se obtivesse o mesmo resultado poderia ser descartada essa hipótese.

De modo geral, pode-se afirmar que a campanha foi vencedora, uma vez que a partir de um *virtual screening* obtém-se taxas menores de compostos com boa interação, e a partir dos 27 compostos iniciais 3 apresentaram  $K_{D_{apps}}$  de ordem próxima a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

### 2.3.2.2 Inibição de Atividade ATPásica

Durante sua atividade *in vivo* as chaperonas moleculares ligam-se a proteína-cliente, auxiliando seu enovelamento até que se atinja seu estado funcional (Silva *et al.*, 2013). Para o desenvolvimento desta atividade a capacidade de se ligar e hidrolisar o ATP é essencial para as

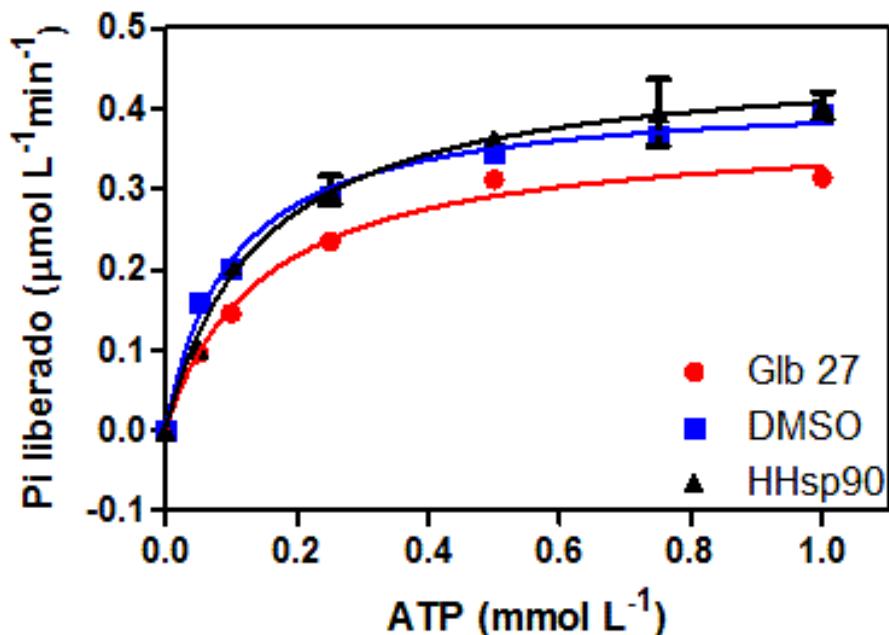
Hsp90 (Panaretou *et al.*, 1998). Durante a hidrólise do ATP uma molécula de fosfato é liberada, de tal forma que a atividade ATPásica pode ser medida no tempo em função do fosfato liberado.

O sítio para ligação do ATP encontra-se no domínio N terminal das Hsp90 (Prodromou *et al.*, 1997). Uma vez que os compostos foram selecionados para se ligarem a esse sítio, espera-se que a medida de fosfato liberado diminua em presença dos compostos estudados.

Dentre os compostos que foram testados por *quenching* selecionou-se o Glb27 uma vez que apresentou os menores valores de  $K_{Dapp}$  para todas as proteínas, o que confere a ele uma maior afinidade pelo sítio de ligação do ATP. Assim testou-se sua capacidade de inibir a atividade ATPásica das proteínas hHsp90 e LbHsp90.

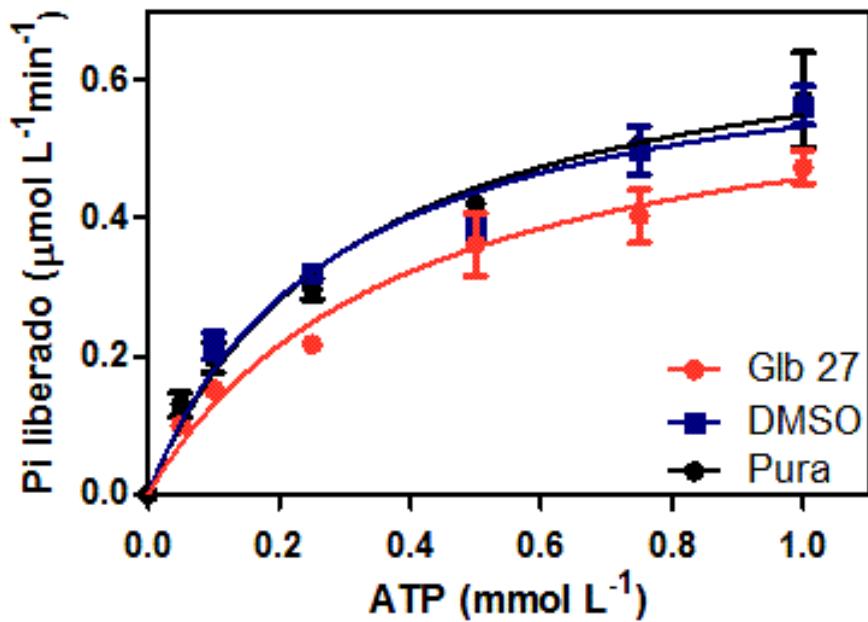
A partir das medidas das absorbâncias nos diferentes poços obteve-se, pela equação da reta, a quantidade de fosfato livre por tempo de incubação (40 minutos) para ambas proteínas. Traçou-se então a quantidade de fosfato livre *versus* concentração de ATP. Como demonstrado nas Figura 18 para a hHsp90 e Figura 19 para LbHsp90.

Figura 18 - Inibição da atividade ATPásica para a proteína hHsp90 a 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em presença do composto Glb27



Fonte: Autoria Própria

Figura 19 - Inibição da atividade ATPásica para LbHsp90 a 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em presença do composto Glb27



Fonte: Autoria Própria

Os gráficos exibidos na Figura 18 e Figura 19 demonstram uma hipérbole retangular, consistente com mecanismo de ação correspondente a uma cinética de Michaelis-Menten (Nelson *et al.*, 2006), conforme a Equação 3.

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

A curva da proteína com DMSO e da proteína pura apresentam perfis muito similares, não sendo possível distingui-los. Por outro lado, ainda que tímida foi possível observar uma inibição da atividade ATPásica por parte do composto Glb27. Adotando-se portanto a equação de Michaelis-Menten obteve-se os valores de  $K_m$  e  $V_{\text{máx}}$  por *fitting* através do GraphPad Prism 5® para ambas proteínas em presença do composto Glb27 exibidas na Tabela 7.

Tabela 7 - Constantes obtidas pela equação de Michaelis-Menten para as proteínas em presença do composto Glb27

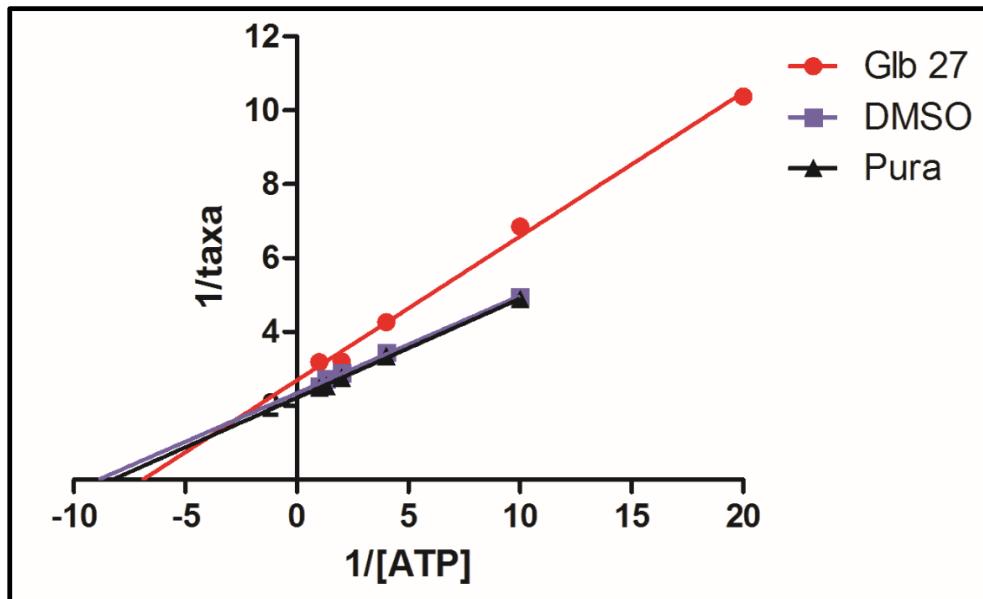
Proteína	Condição	$K_m$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$V_{\text{máx}}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
hHsp90	Pura	$0,14 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,01$
	DMSO	$0,10 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$
	Glb27	$0,15 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,02$
LbHsp90	Pura	$0,31 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,05$
	DMSO	$0,30 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,08$
	Glb27	$0,40 \pm 0,10$	$0,64 \pm 0,07$

Fonte: Autoria Própria

Embora o mecanismo de inibição possa ser visualizado a partir das figuras anteriores, o tratamento matemático partir da equação de Lineweaver-Burk expressa na equação 4 (Nelson *et al.*, 2006) facilita a visualização gráfica, para tal construiu-se os gráficos de duplo recíproco, exibidos nas Figura 20 e Figura 21.

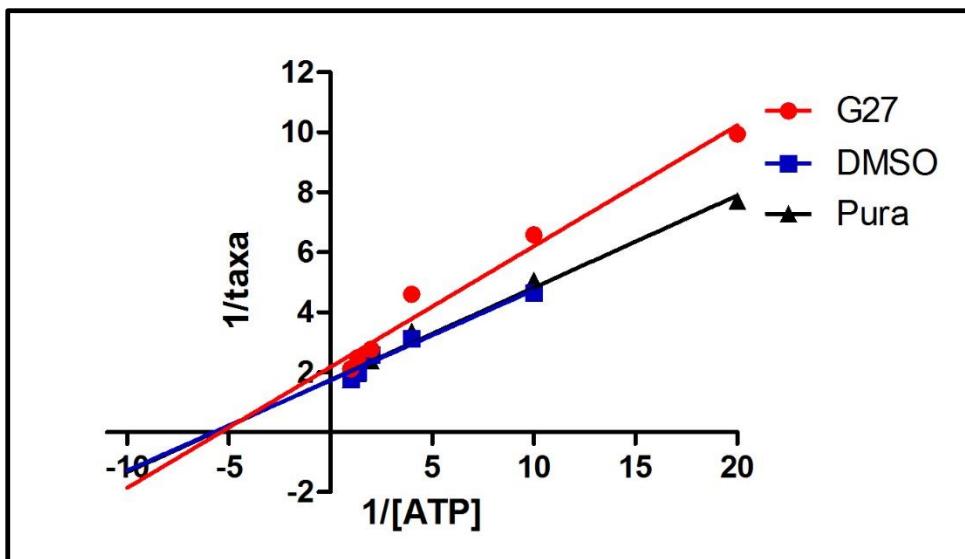
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad (4)$$

Figura 20 - Duplo Recíproco da proteína hHsp90 na ausência e na presença do composto Glb27



Fonte: Autoria Própria

Figura 21 - Duplo Recíproco da proteína LbHsp90 na ausência e na presença do composto Glb27



Fonte: Autoria Própria

Embora fosse esperado que o mecanismo de ação fosse competitivo uma vez que os compostos foram selecionados para se ligarem no sítio do ATP, os gráficos de duplo recíproco sugerem o tipo de inibição mista, onde há cruzamento entre as retas e este cruzamento não ocorre nos eixos (Nelson *et al.*, 2006).

Para a LbHsp90 houve mudança tanto na  $K_M$  quanto em  $V_{máx}$ , no entanto é difícil precisar a mudança pois os erros obtidos nas medidas não permitem distingui-los. Sabe-se que a Hsp90 possui uma baixa atividade ATPásica (Seraphim *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013), no entanto uma hipótese ainda não confirmada é de que a atividade observada pode ser fruto de contaminação visto que já foi relatado que uma concentração de apenas 0,01% de uma ATPase potente pode ser responsável por modificar a observação desta atividade (Jakob *et al.*, 1996).

No que tange a atuação sobre a hHsp90 observa-se com maior clareza a mudança de  $V_{máx}$  enquanto  $K_m$  praticamente permaneceu inalterada.

Dada a equação do mecanismo de inibição pode-se então calcular os fatores  $\alpha'$  e  $\alpha$ , responsáveis pela  $V_{máx_{aparente}}$  e pela  $K_{m_{aparente}}$ . Onde para o tipo de inibição mista (Nelson *et al.*, 2006):

$$V_{máx_{aparente}} = \frac{V_{máx}}{\alpha'}$$

e

$$K_{m_{aparente}} = \frac{\alpha K_m}{\alpha'}$$

Sabe-se que a intersecção no eixo y para a curva do duplo recíproco é igual a  $\alpha'/V_{max}$ .

Então:

$$2,69 = \frac{\alpha'}{0,38}$$

$$\alpha' = 1,02$$

Já a intersecção no eixo x tem-se que seu valor é igual a  $-\alpha'/\alpha K_m$ . Então

$$-6,904 = \frac{-1,02}{\alpha \cdot 0,15}$$

$$\alpha = 0,99$$

Para a inibição do tipo não competitiva, subtipo da mista.  $\alpha \approx \alpha'$ . De forma que:

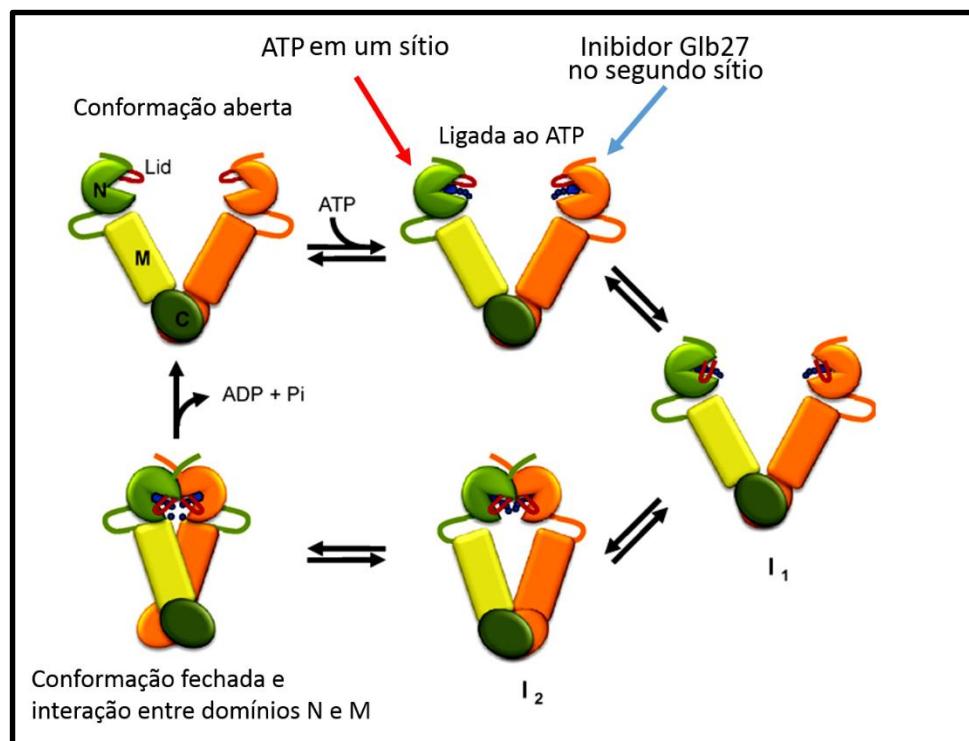
$$K_{m_{aparente}} = \frac{\alpha K_m}{\alpha'} \approx K_m$$

De acordo com os resultados  $K_{m_{aparente}} \approx K_m$

Sabe-se que a Hsp90 é um dímero e que a dimerização é essencial para sua atividade ATPásica de tal forma que durante a ligação ao ATP há formação de uma dimerização transitória do domínio N, que expõe o sítio ativo para a ligação ao ATP, a interação entre os domínios M e N é que permite a hidrólise da molécula de ATP (Richter *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2006; Richter *et al.*, 2008; Wandinger *et al.*, 2008; Hahn, 2009). Há, portanto, a possibilidade de que o composto Glb27 atue como inibidor competitivo para o ATP, em um primeiro sítio do dímero, de modo que no segundo, apesar de permitir a ligação do ATP sua hidrólise não ocorra, agindo como um inibidor misto capaz de se ligar tanto ao complexo proteína-substrato quanto a proteína, agindo em um sítio “distinto” do qual há ligação com o ATP conforme exibido na

Figura 22, a figura exibe o ciclo completo da atividade ATPásica em caso do dímero se ligar a duas moléculas de ATP, porém caso houvesse ligação ao inibidor em um único sítio, o ciclo não prosseguiria, não ocorrendo hidrólise do ATP e liberação de ADP e fosfato inorgânico (Pi). Os resultados de *quenching* reforçam esta ideia uma vez que indicam que o sítio de ligação é no N terminal, próximo ao triptofano, e não em outro sítio da proteína.

Figura 22 - Possibilidade de entrada do inibidor em sítio distinto ao ATP durante o ciclo da atividade ATPase da proteína



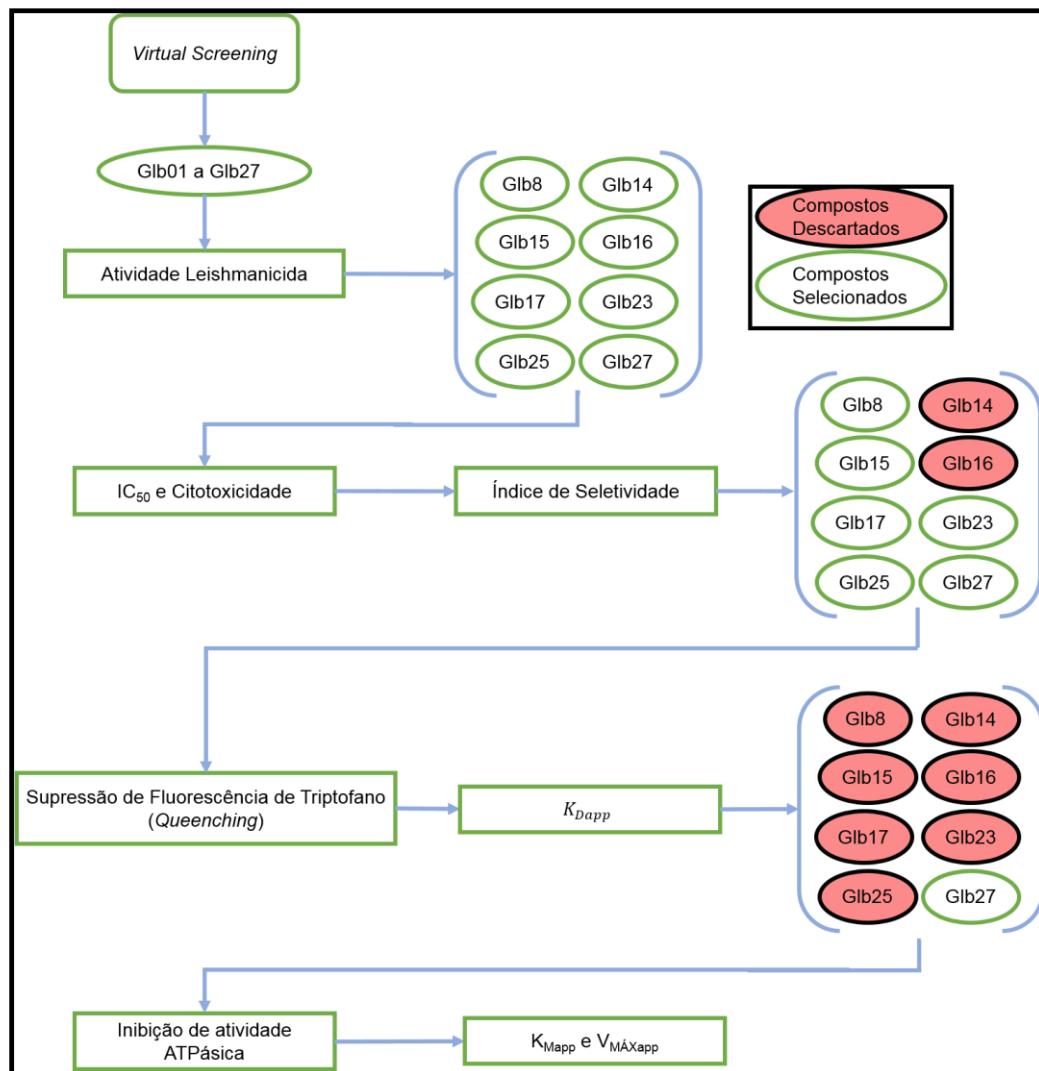
Fonte: Adaptado de (Hahn, 2009)

Embora este mecanismo seja possível, não se pode ainda afirmar categoricamente. Sugere-se a repetição dos experimentos com proteínas em maior grau de pureza e maior quantidade de pontos no início da curva de ATP de modo a se obter pontos mais distantes no duplo recíproco, permitindo uma melhor visualização das inclinações e intersecções das retas para que se possa afirmar o mecanismo.

### 3 CONCLUSÃO

Uma série de 27 compostos selecionados por *virtual screening* contra o domínio N-terminal da Hsp90 de *L. braziliensis* tiveram suas atividades leishmanicida testadas conforme a Figura 23 que exibe o fluxograma de todas as atividades realizadas desde a seleção por *virtual screening*.

Figura 23 - Fluxograma completo das atividades realizadas



Desta série, 8 compostos (Glb8, Glb14, Glb15, Glb16, Glb17, Glb23, Glb25 e Glb27) foram selecionados por resultarem morte celular > 60% e tiveram seus IC<sub>50</sub> determinados tanto contra a forma promastigota de *L. braziliensis* quanto para fibroblastos de camundongo. A partir

do IC<sub>50</sub> observou-se que os compostos Glb17 e Glb27 apresentaram melhor potencial contra células de *L. braziliensis* e Glb14 e Glb15 apresentaram as menores citotoxicidades, e o Glb17 apresentou a maior seletividade, com índice de 14,5.

A interação entre as proteínas Hsp90 humana e de *L. braziliensis* com compostos com atividade leishmanicida foi verificada através de ensaios de *quenching*, nos quais se obteve valores de K<sub>Dapp</sub> muito semelhantes. Estes valores apontam para uma interação com maior afinidade pelas construções dos domínios N-terminal das proteínas avaliadas, assim como para interações equânicas entre as Hsp90 de *Leishmania* e humana. Dentre os valores de K<sub>Dapp</sub> apenas o composto Glb27 apresentou valores abaixo de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e por isso este composto teve sua capacidade de inibir a atividade ATPásica avaliada.

O composto foi capaz de inibir a atividade ATPásica, apresentando uma K<sub>m</sub> praticamente idêntica para a Hsp90 humana e alterando V<sub>máx</sub> por um fator  $\alpha' = 1,02$  sugerindo mecanismo de inibição mista. A LbHsp90 também foi inibida tendo seus valores de K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> alterados, porém não se pode afirmar precisamente o mecanismo devido a valores conflitantes obtidos para ambas proteínas. A identificação do mecanismo de inibição é um trabalho em andamento para o qual sugere-se não só a repetição dos experimentos como melhorar a etapa de purificação das proteínas para se garantir que não haja interferência por alguma ATPase da *E. coli* que pode ter sido co-purificada.

Existe a possibilidade de que os compostos não estejam atuando via Hsp90 devendo o mecanismo ser avaliado posteriormente.

Apesar dos resultados indicarem que o Glb27 não apresenta seletividade significativa para a LbHsp90 frente a hHsp90, este composto ainda é interessante mesmo no contexto da possível inibição da proteína humana para o tratamento de câncer. Portanto, mesmo sem seletividade, o Glb27 pode ser considerado como um potencial candidato a hit e indica que mais experimentos devem ser realizados para averiguar esta potencialidade.

Pode-se concluir que os compostos são promissores e a campanha vencedora, uma vez que apresentaram boas interações a partir de uma primeira geração obtida por *virtual screening*, além disto podem servir de base para uma nova busca resultando em uma nova geração mais eficiente.

## REFERÊNCIAS

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. Protein folding assisted by chaperones. **Protein Pept Lett**, v. 12, n. 3, p. 257-61, Apr 2005. ISSN 0929-8665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777275> >.

BRANDAU, S.; DRESEL, A.; CLOS, J. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus Leishmania. **Biochem J**, v. 310 ( Pt 1), p. 225-32, Aug 1995. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7646449> >.

HAHN, J. S. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. **BMB Rep**, v. 42, n. 10, p. 623-30, Oct 2009. ISSN 1976-6696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874705> >.

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324-32, Jul 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776078> >.

JAKOB, U. et al. Assessment of the ATP binding properties of Hsp90. **J Biol Chem**, v. 271, n. 17, p. 10035-41, Apr 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626558> >.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 3, p. 624-35, Mar 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951723> >.

MICKLER, M. et al. The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 3, p. 281-6, Mar 2009. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234469> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

NELSON, D. L. L.; NELSON, A. L. L.; COX, M. M. **Lehninger: principios de bioquímica**. Cox, Michael M. 2006. (8428214107)

PALLAVI, R. et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **J Biol Chem**, v. 285, n. 49, p. 37964-75, Dec 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837488> >.

PANARETOU, B. et al. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. **EMBO J**, v. 17, n. 16, p. 4829-36, Aug 1998. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707442> >.

PEARL, L. H.; PRODROMOU, C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 271-94, 2006. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756493> >.

PIZARRO, J. C. et al. Exploring the Trypanosoma brucei Hsp83 potential as a target for structure guided drug design. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2492, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24147171> >.

PRODROMOU, C. et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 65-75, Jul 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230303> >.

RICHTER, K. et al. Intrinsic inhibition of the Hsp90 ATPase activity. **J Biol Chem**, v. 281, n. 16, p. 11301-11, Apr 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461354> >.

RICHTER, K.; REINSTEIN, J.; BUCHNER, J. N-terminal residues regulate the catalytic efficiency of the Hsp90 ATPase cycle. **J Biol Chem**, v. 277, n. 47, p. 44905-10, Nov 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235160> >.

RICHTER, K. et al. Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. **J Biol Chem**, v. 283, n. 26, p. 17757-65, Jun 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400751> >.

SERAPHIM, T. V. et al. Low resolution structural studies indicate that the activator of Hsp90 ATPase 1 (Aha1) of Leishmania braziliensis has an elongated shape which allows its interaction with both N- and M-domains of Hsp90. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66822, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826147> >.

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 1, p. 351-61, Jan 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910377> >.

SOUTHWORTH, D. R.; AGARD, D. A. Client-loading conformation of the Hsp90 molecular chaperone revealed in the cryo-EM structure of the human Hsp90:Hop complex. **Mol Cell**, v. 42, n. 6, p. 771-81, Jun 2011. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700222> >.

WANDINGER, S. K.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery. **J Biol Chem**, v. 283, n. 27, p. 18473-7, Jul 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18442971> >.

WHO. World Health Organisation: Control of leishmaniasis. 2007.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 11, p. 3307-16, Nov 2001. ISSN 1059-1524. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694568>>.