

TRIPANOTIONA REDUTASE DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* COMO ALVO MOLECULAR PARA PROSPECÇÃO DE NOVOS INIBIDORES: AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DA GIROXINA DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* COMO INIBIDOR

AMORIM, Juliana Aparecida Vieira^{1,2,3}; SOUZA, Mateus Farias^{1,2}; TABORDA, Jamile Mariano Macedo^{1,5}; LIMA, Anderson Maciel^{1,2}; ARAÚJO, Erika Crhistina Santos^{1,2}; FRANCISCO, Allef Francisco^{1,2}; KAYANO, Anderson Makoto^{1,4}; GUSMÃO, Maria Elisabeth^{1,3}; MARTINS, Marcos Antônio Cabral^{1,3}; ALVES, Filipi Vinícius Santos Mendes^{1,2,3}; RIBEIRO, João Victor Lopes^{1,2,3}; SOARES, Andreimar Martins^{1,2,3}

¹Laboratório de Biotecnologia de Proteínas e Compostos Bioativos Aplicados à Saúde – LABIOPROT – Fiocruz-RO

²Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz-RO

³Centro Universitário São Lucas Afya – UniSL

⁴Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPEM

⁵Instituto Federal de Rondônia – IFRO

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por parasitos do gênero *Leishmania*. Essa patologia está presente em diferentes regiões do mundo. O arsenal terapêutico limitado dificulta a contenção desta doença. Neste contexto, a Tripanotiona redutase se apresenta como um alvo molecular relevante para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da leishmaniose. Esta enzima é essencial no metabolismo do parasito, catalisando a redução da tripanotiona, mantendo um ambiente redutor no interior do parasito. Com isso, o objetivo desse projeto é avaliar atividade antiparasitária da giroxina de *Crotalus durissus terrificus* sobre a *Leishmania braziliensis* e verificar a sua ação sobre a capacidade catalítica da tripanotiona redutase. Sendo assim, o modelo estrutural teórico da TR de *L. braziliensis* (UniProt A4H480) foi gerado pela ferramenta AlphaFold. Para a construção da TR Lb na sua conformação nativa, foi utilizada como referência a estrutura TR *L. infantum* (PDB ID 4ADW). A interação entre a TR Lb e a giroxina (UniProt B0FXM2) estrutura teórica gerada pelo AlphaFold foram investigadas por meio de docagem molecular usando a ferramenta ClusPro 2.0. O veneno da serpente foi obtido de banco de venenos do LABIOPROT e fracionado por cromatografia de exclusão molecular, em uma coluna Superdex G75. A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry modificado. Posteriormente a isso, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras. Paralelamente, foi realizada a expressão do alvo molecular TR Lb utilizando o vetor pET 28(a+) e transformadas em células *E. coli* BL21(DE3). Para a purificação da proteína expressa, foi realizada uma cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA Agarose. Após isso, foi feita a avaliação da atividade enzimática da Tripanotiona redutase, contendo a enzima em presença de tampão HEPES 40 mM e 1 mM EDTA a pH 7,5; 0,15 mM NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), 25 μ M DTNB 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) e 1 μ M T[S]2 (Sal de trifluoroacetato de tripanotiona) testando concentrações diferentes de substrato (0.15; 0.45; 0.75; 1.05; 1,35; 1.65; 1.9 μ M.). Como resultados, os ensaios *in silico* indicaram que a giroxina foi capaz de interagir com o sítio catalítico da enzima alvo, abrindo possibilidades para o desenvolvimento de novas pesquisas na área. Temos que a Tripanotiona redutase foi expressa e purificada com alto grau de pureza e com sua atividade catalítica preservada, compatíveis com a literatura. O fracionamento do veneno de *C.d.t* resultou em 5 frações enriquecidas com as toxinas de interesse utilizando perfil cromatográfico e massa molecular como comparação com a literatura. Concluindo então, que a docagem

molecular apontou que a gioxina e a *TRLb* possuem interação. O método cromatográfico escolhido foi eficaz para o fracionamento do veneno de *Crotalus durissus terrificus*,

Palavras-chave: Leishmaniose; Tripanotona redutase; *Crotalus durissus terrificus*

E-mail: julianapvieira@gmail.com, andreimarsoares@gmail.com